

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní



**Kombinace 3D tisku a nanovláken pro tkáňové
inženýrství kloubní chrupavky**

**The combinaton of 3D printing and nanofibers for
tissue engineering of articular cartilage**

Studijní program:	N3106 / Textilní inženýrství
Studijní obor:	3106T018 / Netkané a nanovláknenné materiály
Autor práce:	Bc. Martin Pelcl
Vedoucí práce:	Ing. Jiří Chvojka Ph.D.
Konzultant práce:	Ing. Věra Jenčová Ph.D.

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin Pelcl**
Osobní číslo: **T12000499**
Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**
Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**
Název tématu: **Kombinace 3D tisku a nanovláken pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky**
Zadávající katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Vypracování rešerše na téma kombinace technologií rapid prototyping, elektrostatického zvlákňování a dalších doplňkových metod.
- 2) Navržení postupu výroby a materiálu pro zhotovení tkáňového nosiče.
- 3) Testování a zjišťování vlastností vyrobeného nosiče.
- 4) Zpracování zjištěných poznatků, popřípadě navržení optimalizace řešení.



Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- 1) Dietmar W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, Biomaterials, č. 21, 2000, str. 2529 -2543
- 2) Su A. Park, Hyo Joo Kim, Su Hee Lee, Fabrication of Nano/Microfiber Scaffolds Using a Combination of Rapid Prototyping and Electrospinning Systems, POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE, 2011
- 3) GeunHyung Kim, JoonGon Son, SuA Park, WanDoo Kim, Hybrid Process for Fabricating 3D Hierarchical Scaffolds Combining Rapid Prototyping and Electrospinning, Macromolecular Journals, č. 29, str. 15771581

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce:

18. října 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

8. ledna 2015

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 18. října 2013

PROHLÁŠENÍ

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG

Datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Jiřímu Chvojkovi Ph.D a konzultantce Ing. Věře Jenčové Ph.D za poskytnutí svého volného času, cenných rad a zájem při vedení této diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat celé katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů na Technické univerzitě v Liberci, poté Ing. Jiřímu Šafkovi Ph.D a Mgr. Kateřině Pilařové za pomoc v laboratořích a za poskytnutí cenných rad pro experimentální část této práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině, přítelkyni a blízkým přátelům za velkou psychickou podporu v průběhu mého studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá studiem kombinace metody 3D tisku s nanovláknny pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky – vývoj tkáňového nosiče pro nahrazení poškozené chrupavčité tkáně.

První část práce je věnována řešerši, která byla vypracována na dané téma a z níž bylo vycházeno dále při tvorbě práce.

Teoretická část je zaměřena na biologii hyalinní chrupavky, proces tkáňového inženýrství a dále zde jsou konkrétně představeny přístroje, materiály a postupy, které byly využity v experimentální části.

V experimentální části je v časové posloupnosti popsán postup výroby tkáňového nosiče a jeho testování. Jsou zde uvedeny dosažené výsledky, které jsou dále rozebrány a vyhodnoceny.

Klíčová slova

nanovláknna, 3D tisk, tkáňové inženýrství, tkáňový nosič, kloubní chrupavka

ANNOTATION

This thesis discusses the combination of 3D printing method with nonwovens for tissue engineering of articular cartilage - development of scaffold for replacing damaged cartilaginous tissue.

The first part is focused on research, which is a basis for further work.

The theoretical part is about biology of hyaline cartilage, tissue engineering process and there are specifically introduced equipment, materials and procedures that were used in the experimental part.

The experimental part is about description of process for the production of tissue carriers and their testing in chronological way. There are obtained results, which are discussed and evaluated.

Key words

nonwovens, 3D print, tissue engineering, scaffold, articular cartilage

Seznam zkratek a symbolů

3D	trojrozměrná dimenze	
Au	značka prvku zlata	
CAD	Computer Aided Design – počítačem podporované navrhování	
CAM	Computer Aided Manufacturing – počítačem podporovaná výroba	
EMEM	Eagle's minimal Essentials medium – buněčný kultivační roztok	
FBS	Fetal bovine serum – část krevní plazmy	
FDA	Food and Drug Administration - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv	
G5	částice fosfátu kalcia	
in-vitro	testování v laboratorních podmínkách	
in-vivo	testování prováděné na zvířatech	
MED 610	firemní označení biokompatibilního polymerního materiálu	
MG 63	linie lidských kostních buněk	
MTT	test buněčné viability	
n_c	celková pórovitost předmětu	[-]
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr	
PCL	polykaprolakton	
PCL 14k	polykaprolakton o molární hmotnosti 14 g/mol	
PCL 45k	polykaprolakton o molární hmotnosti 45 g/mol	
PEG	polyetylen-glykol	
PGA	kyselina polyglykolová	
PLA	kyselina polymléčná	
PLGA	kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové	
POE	polyorthoester	
PVA	polyvinyl alkohol	
SEM	řádkovací elektronová mikroskopie	
TEM	transmisní elektronová mikroskopie	
V_c	celkový objem předmětu	[mm ²]
V_p	objem pórů v předmětu	[mm ²]

Obsah

1	Úvod	10
2	Rešeršní část	11
2.1	Rapid prototyping.....	11
2.2	Electrospinning	14
2.3	Kombinace 3D tisku s dalšími metodami	15
2.3.1	3D tisk + elektrické zvlákňování.....	15
2.3.2	Využití hydrogelů u scaffoldů s nanovláknennou vrstvou.....	18
2.3.3	3D tisk + luhování	20
2.4	Možné úpravy materiálů při výrobě scaffoldu	21
2.5	Rozměrové parametry scaffoldů	24
3	Teoretická část.....	25
3.1	Hyalinní chrupavka	25
3.1.1	Degenerace a regenerace chrupavky	26
3.2	Tkáňové inženýrství a požadavky kladené na scaffoldy.....	26
3.3	Buněčné testování	27
3.3.1	MTT test.....	28
3.3.2	Fluorescenční mikroskopie.....	28
3.3.3	Elektronová mikroskopie	29
3.4	Materiály použité při výrobě scaffoldu	29
3.4.1	Polymerní materiál MED 610	29
3.4.2	Polykaprolakton (PCL).....	30
3.5	Použitá výrobní zařízení.....	32
3.5.1	3D tiskárna Connex 500	32
3.5.2	Nanospider – 1NSW500U.....	33
4	Experimentální část	35
4.1	Výroba scaffoldu základní technologií	35

4.2	Návrh skládaného scaffoldu	38
4.3	Výroba skládaného scaffoldu	40
4.4	Začlenění nanovlákných vrstev	42
4.4.1	Příprava zvláknovacích roztoků	42
4.4.2	Nanesení nanovlákné vrstvy na scaffold	43
4.5	Biologické testování scaffoldu	46
4.5.1	Příprava a kultivace buněčné kultury	46
4.5.2	Příprava testovaných scaffoldů	47
4.5.3	Osazení scaffoldu buňkami	48
4.5.4	Testy buněčné viability a adheze.....	49
4.5.5	Testování toxicity materiálů	51
4.6	Testování druhého typu scaffoldu	53
4.6.1	Výroba scaffoldu	53
4.6.2	Biologické testování scaffoldu	53
5	Diskuze	57
6	Závěr.....	59
	Použitá literatura	60

1 Úvod

Kloubní onemocnění v současné době patří mezi jednu z nejrozšířenějších chorob. Spousta z nás má také osobní zkušenosti s nějakou kloubní nemocí, například osteoporózou nebo jinou chorobou. Indispozice vyžaduje určitou a dlouhodobou léčbu, pokud tato léčba selže, přichází na řadu chirurgický zákrok – výměna postiženého kloubu za umělou náhradu. Tkáňoví inženýři se v poslední době zabývají vývojem buněčného nosiče (dále už jen scaffold), který by mohl postiženou kloubní chrupavku nahradit a pacient by se vyhnul velkému chirurgickému zákroku a další dlouhodobé rehabilitaci.

Cílem této diplomové práce bylo zhotovit vhodný scaffold pro tkáňové inženýrství chrupavky pomocí kombinace dvou navzájem se doplňujících metod. První metodou byl 3D tisk, kterým lze efektivně vytvořit nosnou část scaffoldu a druhou elektrostatické zvlákňování, pomocí kterého lze připravit prostor pro buněčnou proliferaci. Základním krokem bylo tedy provedení rešerše na zadané téma. Dalším pak v návaznosti na získané poznatky navrhnout vhodné metody výroby scaffoldu a provést testy, které jsou nezbytné pro další výzkum.

První část práce je věnována zhotovené rešerši a je zde popsáno několik studií, které se zabývaly danou problematikou od kombinace obou metod až po další úpravy doplňkovými technologiemi a modifikace materiálů. V následující, teoretické části je obecně přiblížen proces tkáňového inženýrství, materiály, výrobní zařízení a testovací metody, které byly použity při experimentu, jemuž je poté věnována následující kapitola. Experimentální část obsahuje přesný postup, jak výroba a testy scaffoldů probíhaly, včetně všech získaných poznatků a jejich vyhodnocení.

2 Rešeršní část

Cílem zhotovení rešerše na dané téma bylo získat a zpracovat poznatky publikované vědci v oblasti kombinace rapid prototypingových technologií s dalšími doplňkovými metodami, především v kombinaci s nanovláknennými vrstvami. Tyto dvě hlavní metody, které byly použity při experimentu, jsou popsány v následujících kapitolách 2.1 a 2.2.

2.1 Rapid prototyping

Rapid prototyping je výrobní systém, který se objevil v roce 1987. Jednalo se o zavedení stereolitografie, procesu kdy řízený laserový paprsek vypaluje kapalným polymerem vrstvu po vrstvě, než vznikne požadovaný objekt. V následujících letech byly zavedeny další metody výroby, jako například selektivní laserové slinování a vrstvení membrán. Úplně první 3D rapid prototypingový systém v tomto odvětví na základě ukládání a formování taveniny byl představen v dubnu 1992 firmou Stratasys.^[1]

Tato výrobní technologie, jejíž název se skládá ze dvou slov - **rapid** = rychlý a **prototype** = prototyp skýtá možnost vytvoření modelu pomocí počítače, včetně možné simulace jeho budoucích vlastností. Jedná se o technologii, pomocí které mohou být vyrobeny předměty tvarově složité za zlomek času oproti technologiím klasickým a to z důvodu, že odpadají procesy, jako je například lepení, svařování atd. Výrobky jsou většinou prostorové předměty se samostatnou konstrukcí. Metoda 3D tisku spočívá v kombinaci počítačové předlohy a automatizované technologie tisku. Technologie v oboru tkáňového inženýrství je využívána především k tisku trojrozměrných scaffoldů. Takto vyrobené scaffoldy mají dobré mechanické vlastnosti, dokonce lepší než u použití jiných známých metod výroby. Velkým plusem této metody výroby je v posledních letech veliký zájem o tuto technologii a díky tomu bylo vyvinuto i několik různých technik. Jednotlivé techniky se liší v mnoha ohledech jako například dávkovací systém a počítačové CAD/CAM nástroje. Jedná se tedy o technologii velice všestrannou, snadno reprodukovatelnou, která využívá širokou škálu materiálů a má přesné ovládání. Díky elektronickému řízení a počítačem vytvořenému modelu je hlavní výhodou možnost přesné kontroly výsledného tvaru scaffoldu, jeho pórovitost a propojenost pórů, což u mnoha dalších metod není možné. Nevýhodou je naopak to, že výsledné póry scaffoldu jsou příliš velké a povrch naneseného materiálu je příliš hladký.

Buňky mají problém na nosič adherovat a dále proliferovat. Samotný proces tisku probíhá následovně – tavenina polymeru je nanášena podle dané předlohy na pracovní plochu přístroje kde dochází k jejímu síťování, ochlazení a zatuhnutí. Tento proces automaticky probíhá, dokud není vytvořen celý trojrozměrný objekt. Další výhodou tisku je možnost vytváření hybridních scaffoldů. To znamená, že lze tisknout biologické látky, jako jsou přidané suspenze buněk, a tím je přímo vnášet do vytvářeného scaffoldu. Rapid prototyping však poskytuje mnoho dalších metod jako je například: selektivní laserové spékání, modelování laminovaných objektů, modelování ukládáním taveniny atd. Rapid prototyping je dále popsán v kapitole 5.1. Není to však jediná technologie, která je používána k výrobě scaffoldů. Mezi další technologie patří například vymývání částic, sušení za mrazu, solvent casting, výroba netkanou cestou atd. Několik z nich je uvedeno v tabulce č. 1, kde jsou i popsány vlastnosti scaffoldů jimi vyrobenými. [2] [3]

Tabulka č. 1: Výrobní technologie a vlastnosti daných scaffoldů. [3]

Výrobní technologie	Zpracování	Materiálové požadavky***	Velikost pórů [μm]	Porosita [%]	Hodnocení scaffoldů
Solvent casting* + vymývání částic	Odlévání / Lití	Rozpustnost v daném rozpouštědle	30 – 300	20 – 50	Sférické póry, solné částice zůstávají v matici
Laminace membrán	Lepení vrstev	Rozpustnost v daném rozpouštědle	30 – 300	< 80	Nepravidelná struktura pórů
Netkaná cesta	Vpichování	Vhodná vlákenná surovina	20 – 100	< 95	Nedostatečné mechanické vlastnosti
Sušení za mrazu	Odlévání / Lití	Rozpustnost v daném rozpouštědle	< 200	< 97	Vysoká propojenost porézní mikrostruktury
Separace fází	Odlévání / Lití	Rozpustnost v daném rozpouštědle	< 200	< 97	Vysoká propojenost porézní mikrostruktury
RP** - 3D tisk	Formování taveniny	Tavitelnost materiálu	45 - 150	< 60	100% propojenost pórů, dobré mechanické vlastnosti
RP – ukládání taveniny	Formování taveniny	Tavitelnost materiálu	> 150	< 80	100% propojenost pórů, dobré mechanické vlastnosti

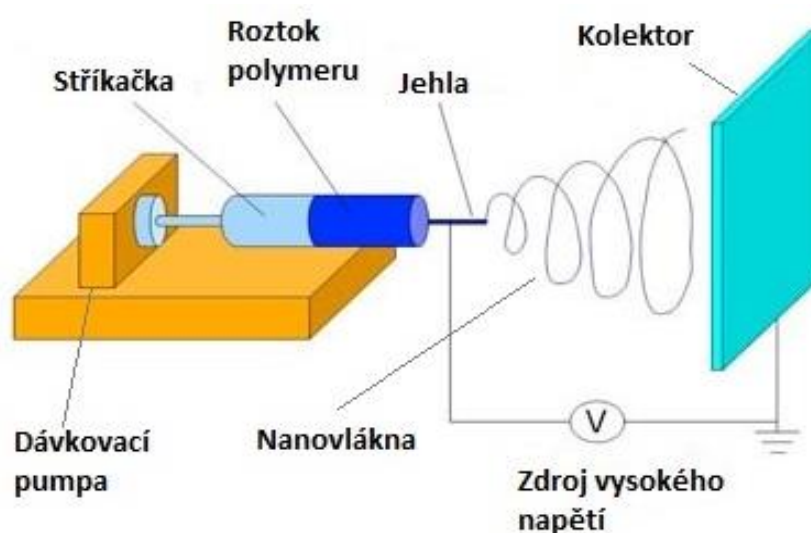
* Technologie založená na vypařování rozpouštědla z polymerního roztoku, ** Technologie Rapid Prototyping, *** Požadavky, které musí základní materiál mít, aby mohl být zpracovaný zvolenou technologií

V další části této práce je i přes velké množství použitelných metod věnována pozornost pouze metodám formování tavení taveniny, 3D tisku a jejich kombinacím s dalšími doplňkovými metodami. To především z toho důvodu, že jiné metody nebyly v experimentu použity a ani laboratoře TUL zatím nedisponují zařízením pro jiný typ výroby.

Jak je uvedeno v tabulce č. 1 metody rapid prototypingu (3D tisku) umožňují vytvořit scaffoldy o dobré propojenosti pórů i mechanických vlastnostech, což je při tkáňovém inženýrství chrupavky žádoucí a jeví se tedy jako vhodná metoda pro výrobu a další zkoumání.

2.2 Electrospinning

Electrospinning, neboli elektrické zvlákňování je jedna z nejmodernějších textilních technologií pro výrobu ultra jemných vláken (schéma výrobního zařízení na obrázku č. 1). O nanovlákněch hovoříme, pokud se jejich průměr pohybuje v hodnotách pod $1\mu\text{m}$. V případě potřeby je však možné vyrobit i vlákna silnější a to o průměrech $1 - 3\mu\text{m}$. I když se o nanovlákněch více hovoří až posledních letech, historie této technologie sahá daleko do minulosti. Oproti jiným výrobním technologiím spočívá kouzlo technologie v její jednoduchosti, kdy se polymerní roztok samoorganizuje do formy nanovláken pouze za pomoci elektrického pole. Právě zmíněnou jednoduchost, oblíbenost a potenciál patří tato metoda mezi nejrozšířenější nanotechnologii, pomocí které lze vyrábět širokou škálu materiálů s neobvyklými vlastnostmi. Z tohoto hlediska je technologie vhodná nejen pro tkáňové inženýrství, ale i medicínu obecně. Lze například připravit kryty ran, antibakteriální a ultra jemné filtry, nosiče pro kontrolované uvolňování léčiv. [4] [5]



Obrázek č. 1: Základní uspořádání jehlové zařízení pro elektrostatické zvlákňování

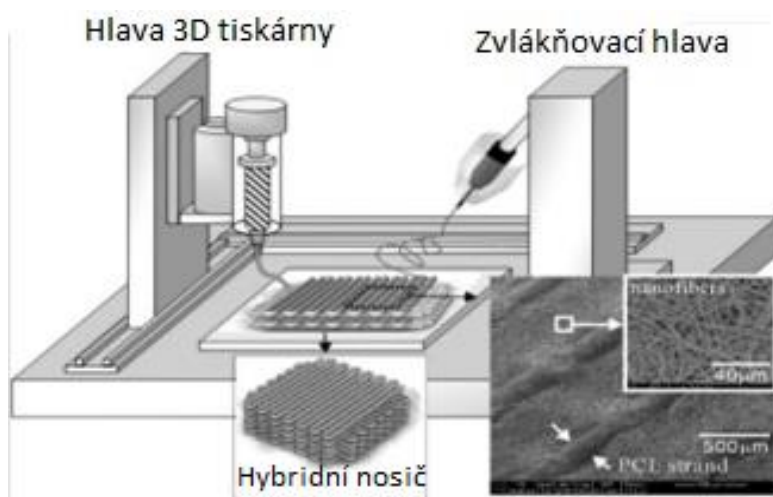
2.3 Kombinace 3D tisku s dalšími metodami

Scaffolds vyrobené pomocí 3D tisku se přes většinu dobrých vlastností potýkají s řadou nevýhod. Jednou z nich je, že nosič má příliš velké póry, buňky se v nich nezachytí a propadávají nosičem. Dále je to špatná adheze buněk přímo na vytištěné konstrukci nebo nevyhovující podmínky pro buněčnou proliferaci. Několik navrhovaných úprav řešících tyto nedostatky je popsáno dále v kapitolách 2.3.1 – 2.3.3.

2.3.1 3D tisk + elektrické zvlákňování

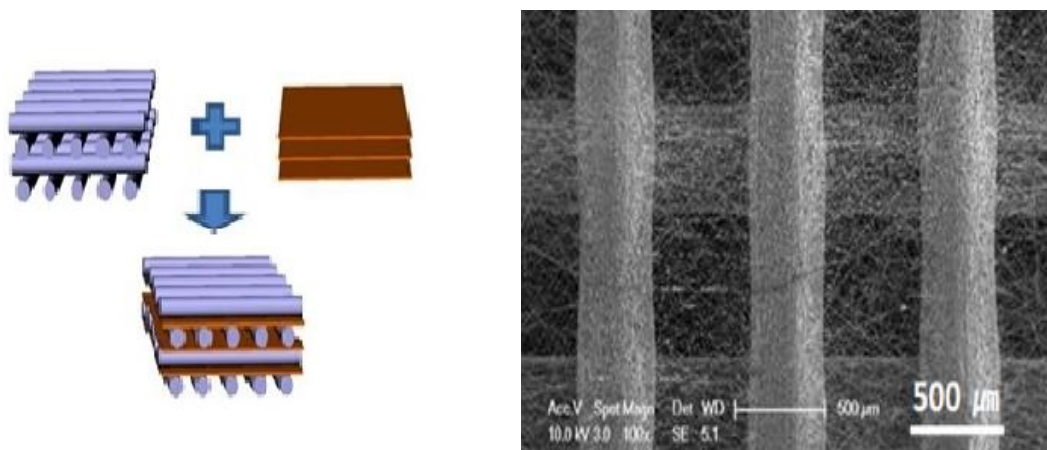
Jedna z nejvyužívanějších kombinací je technologie hybridního tisku, která spojuje metodu 3D tisku a metodu elektrického zvlákňování. Výsledná struktura se skládá ze střídajících se vrstev vytvořených 3D tiskárnou a vrstev vytvořených elektrickým zvlákňováním. Samotný proces probíhá tak, že je vytvořený počítačový model, podle kterého tiskárna vytvoří vrstvu po vrstvě daný nosič. Každá takto položená vrstva je prokládána vrstvou nanovláken. Hlava zařízení bývá vyrobena z nerezové oceli a je zakončena mikrotryskou, skrz niž je dávkován materiál, který je taven pomocí topné spirály a přiváděn v potřebném množství dávkovačem řízeným stlačeným vzduchem. Mezi parametry ovlivňující výrobní proces patří teplota tavení použitého polymeru, průměr trysky, rychlost posuvu a tlak vzduchu v dávkovači. Na protější straně je poté umístěn electrospinner tvořící prokladové vrstvy (obrázek č. 2). [6]

[7]



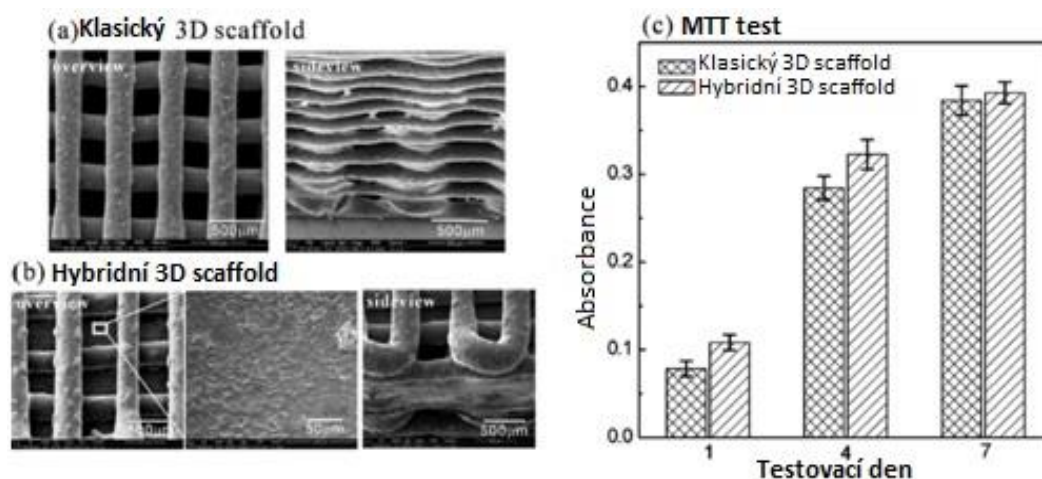
Obrázek č. 2: Schéma přístroje pro hybridní tisk [7]

Bylo zjištěno, že lze vytvořit trojrozměrnou strukturu, s lepšími vlastnostmi a to především díky tomu, že na prokladové nanovlákně vrstvě buňky dobře adherují a nepropadnou scaffoldem. Díky orientaci vláken, jejich velkému měrnému povrchu a ideální velikosti pórů zde buňky velmi dobře proliferují. To vše bylo dosaženo, aniž by byla nějak výrazně snížena pórovitost scaffoldu. Je dobře známo a bylo již zmíněno, že tkáňové nosiče vyrobené konvenčně nepodporují růst buněk ve vnitřní struktuře. Naopak při použití hybridní technologie výroby je zhotovený nosič s řízenou mikrostrukturou schopen propustit tok živin i kyslíku hluboko do vnitřní struktury a nanovlákněná vrstva zabrání propadu buněk. Názorné zobrazení výroby hybridního scaffoldu a jeho mikroskopický snímek je zobrazen na obrázku č. 3. [6] [7] [8]



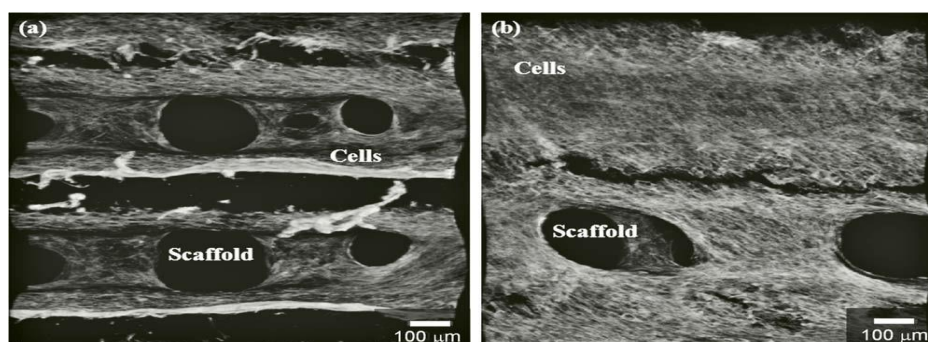
Obrázek č. 3: Schéma hybridního scaffoldu a mikroskopický snímek konečného výrobku [8]

Vytvořená struktura byla vhodná pro nasazení buněk, jejich prorůstání, prokrvení tkáně, ale z hlediska mechanického stále nedosahovala vhodných vlastností. Mechanické nedostatky byly způsobeny nanostrukturou, u které se mechanické vlastnosti zjišťují velice obtížně, ale jsou zřejmě nedostatečné. Potřebné mechanické vlastnosti lze ovlivnit. Při výzkumu bylo zjištěno, že mechanické vlastnosti scaffoldu vyrobeného hybridní technologií, lze korigovat změnami jeho geometrie (poměr tloušťky jednotlivých vrstev atd.). Při porovnání hybridního a klasického scaffoldu ve směru proliferace buněk bylo dosaženo lepších výsledků u scaffoldu hybridního. Buňky se po nanovlákněné vrstvě dobře rozprostřely a vyplnily prostor. Výsledky naznačují, že proložení nanovlákněnou vrstvou přispívá k adhezi buněk, jejich proliferaci a tím k rychlé a stabilní tvorbě nové tkáně (obrázek č. 4). [6] [7]



Obrázek č. 4: Porovnání klasického a hybridního scaffoldu [7]

Výzkumem popisované kombinace metod se zabývalo mnoho vědců a jejich publikované výsledky byly vždy kladné. Ve všech případech bylo zjištěno a je zobrazeno na obrázku č. 5, že po stejně dlouhé době vytváří buňky u hybridního nosiče mnohem hustší vrstvy, dobře proliferují a lépe zaplňují póry.



Obrázek č. 5: Porovnání růstu buněk na dvou různých scaffoldech [7]
 (a) Běžný scaffold (b) Hybridní scaffold

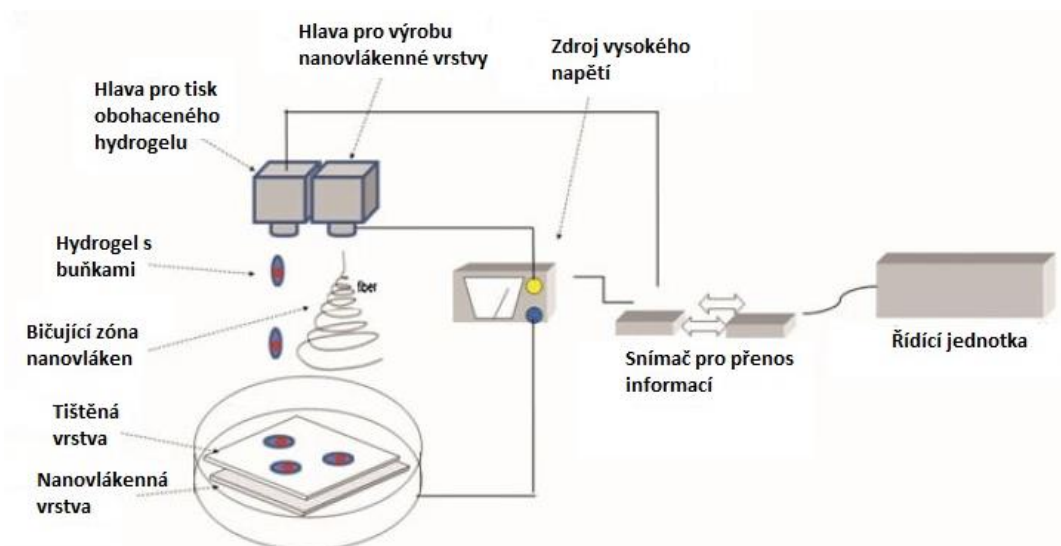
Oba zobrazené scaffoldy byly dále zkoumány in-vivo a to na pokusných králících. Při tomto pokusu se nejednalo o náhradu kloubní chrupavky, ale o kostní náhradu. U kostních implantátů byly výsledky uspokojivé a opět prokazují přínos dané kombinace výrobních metod. U hybridního nosiče byla pozorována lepší tvorba nové kostní tkáně a to daleko výrazněji nežli u druhého nosiče i s rozsáhlejší mineralizací a tvorbou osteoblastů, což jsou buňky produkující kostní matrix. Po osmi týdnech bylo pozorováno rozhraní mezi nově tvořenou a původní kostní tkání, zde bylo znovu dosaženo lepších výsledků u hybridního scaffoldu. [6] [7] [8]

Kombinací dvou výše zmíněných metod byli vědci schopni odstranit nevýhodu 3D tisku, kterou jsou příliš velké póry scaffoldu. Adheze buněk a jejich proliferace nebylo přidanou nanovláknennou vrstvou nijak negativně ovlivněno. Naopak byly zjištěny velice pozitivní a povzbudivé výsledky. Hybridní scaffoldy jsou tedy dobrým příslibem do budoucna pro výrobu buněčných nosičů.

2.3.2 Využití hydrogelů u scaffoldů s nanovláknennou vrstvou

Hydrogely jsou zesíťované hydrofilní polymery, které se řadí mezi nejdůležitější skupiny biomateriálů pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu. Díky své vysoké hydrofilitě při kontaktu s vodou bobtnají a dokáží jí tak pojmout velké množství, v některých případech až třistanásobek svého původního objemu. Díky zesíťování struktury nedojde k jejich rozpadu či rozpuštění, ale k dosažení vlastností jako u měkkých tkání. Právě zmíněná nasákavost umožňuje široké použití hydrogelů, jelikož s vodou je možné do jejich struktury vpravit například buňky nebo další potřebné látky jako jsou léčiva nebo antibiotika. Mezi další vlastnosti hydrogelů, díky kterým jsou hojně používány, patří dobrá biokompatibilita a nulová toxicita vůči nasazeným buňkám. Polymery, které přirozeně tvoří hydrogely, jsou například algináty, kyselina hyaluronová, fibrin a další. [9]

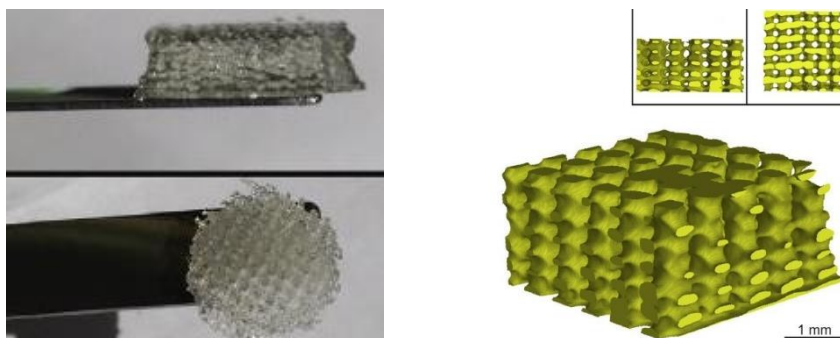
Jak již bylo zmíněno výše, hydrogely jsou v tkáňovém inženýrství a biomedicině využívány poměrně často a tak jsou používány i ve vývoji náhradních chrupavek. Využití je především z důvodu, že jejich složení a struktura se blíží původní tkáni. Nicméně jejich mechanické vlastnosti se pohybují od nízkých po střední hodnoty. Scaffoldy pouze z těchto materiálů by tedy nosnou funkci plnit nemohly a proto jsou kombinovány s dalšími metodami. V tomto případě byl nosič vytvořen 3D tiskem s nanovláknem, které prokládaly celý scaffold. Na vytvořenou vrstvu z nanovláken byl vždy aplikován hydrogel obohacený o dané buňky (obrázek č. 6). Hydrogel poskytoval buňkám dobré prostředí pro jejich proliferaci. Buňky byly naneseny na každou položenou vrstvu. To zajistilo, že jejich růst probíhal bez problémů i uvnitř nosiče. Kladný vliv měla na růst i nanovláknenná vrstva, skrz kterou buňky dále nepropadly a mohly se po ní proliferovat do všech směrů. Tím by měl být zajištěn rovnoměrný růst tkáně v celém prostoru scaffoldu. Takto vyrobený nosič dosáhl dobrých výsledků jak při in-vitro, tak in-vivo testech. [9]



Obrázek č. 6: Schéma postupu výroby scaffoldu [9]

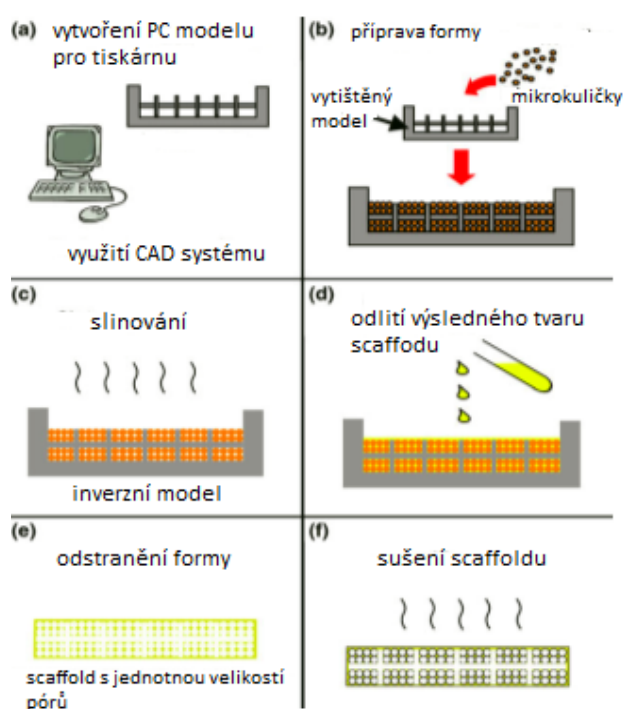
Článek zabývající se touto problematikou prokázal, že nanášení buněk vrstvu po vrstvě společně s hydrogelem je metodou vhodnou pro využití v tkáňovém inženýrství. Zvolená metoda není finančně náročná a díky 3D tisku můžeme kontrolovat pórovitost scaffoldu a hlavně propojení těchto pórů. Použitá vrstva vytvořená elektrickým zvlákňováním zase zajistí dobrý podklad pro nanesení buněk a zabrání jejich propadávání velkými póry scaffoldu. [9]

Jako další krok biotisku je snaha tisknout scaffoldy přímo z obohacených hydrogelů. Tyto výzkumy se však setkávali se dvěma problémy. Prvním - špatné mechanické vlastnosti měly za důsledek zhroucení vnitřní porézní struktury a musely být tedy kombinovány s materiály, které přispěly k zlepšení mechanických vlastností. Druhý problém nedovoloval tisknout hydrogel přímo obohacen potřebnými buňkami, jelikož v průběhu tisku docházelo k jejich úmrtí. Bylo tedy třeba 3D tiskárny upravit tak, aby tisk probíhal co nejšetrněji. Výsledkem úprav byla takzvaná biotiskárna neboli bioplotter. Úpravy se týkaly především teploty, pod kterou byla želatina tištěna, hlava tiskárny byla upravena tak, aby teplota dávkovací jehly byla v celé její délce homogenní, ale naopak plocha pro tisk byla chlazená pod bod gelování. Dalšími řízenými parametry tisku byly tlak vzduchu dávkovače a průměr dávkovací jehly. Bylo nutné zvolit vhodný hydrogel a jeho zpracování před i po tisku. Příklad scaffoldu vyrobeného touto metodou je představen na obrázku č. 7. Podrobnějším popisem této metody se zabývá článek od Billieta T. a Gevaerta E [10].



Obrázek č. 7: Scaffold vyrobený metodou biotisku [10]

2.3.3 3D tisk + luhování



Obrázek č. 8: Postup výroby scaffoldu [11]

těchto pórů což je velice důležité. Pro buňky stačí póry o velikosti několik desítek mikrometrů a kombinací těchto metod je možné dosáhnout mikroporézního nosiče. Póry jsou vytvořeny pomocí rovnoměrně rozložených mikročástic v celém prostoru formy scaffoldu. Takovéto uspořádání je zajištěno určitým způsobem ultrazvukového míchání. Postup výroby tohoto nosiče je zobrazen na obrázku č. 8. [11]

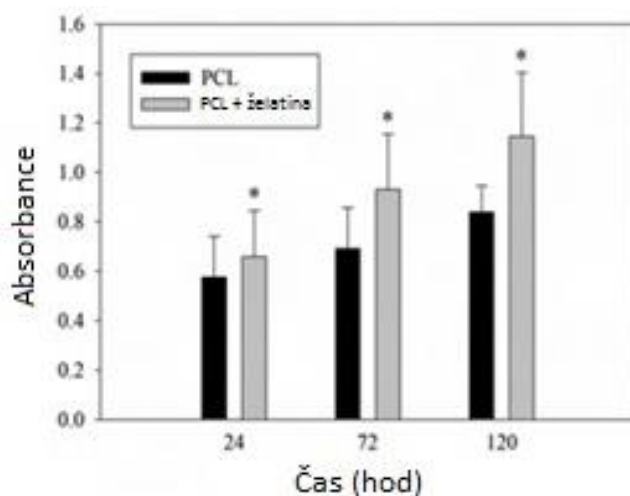
Kuličky byly vytvořeny rozpuštěním polystyrenu v dichlormethanu. K této emulzi byl přidán polyvinyl alkohol (PVA), jako povrchově aktivní látka, aby nedošlo ke koagulaci. Rozpouštědlo se při míchání vypařilo a nadále zůstaly pouze samostatně oddělené mikrokuličky, jejichž velikost určuje i velikost samotných pórů scaffoldu.

Kuličky jsou v isopropanolu naneseny na vyrobenou mříž, poté se isopropanol odpaří a následně se provede slinování při 110 °C. Výsledkem slinování je základní mřížka, která určí, jak bude materiál porézní. Vyrobený nosič byl při biologickém otestování shledán jako netoxický. ^[11]

Popisované studie dokazují, že 3D tisk je vhodnou metodou a to jak pro výrobu hlavní nosné části, tak i podpůrnou technikou pro výrobu pomocné formy, která svojí přesnou výrobou zaručí i přesné rozměry výsledného scaffoldu.

2.4 Možné úpravy materiálů při výrobě scaffoldu

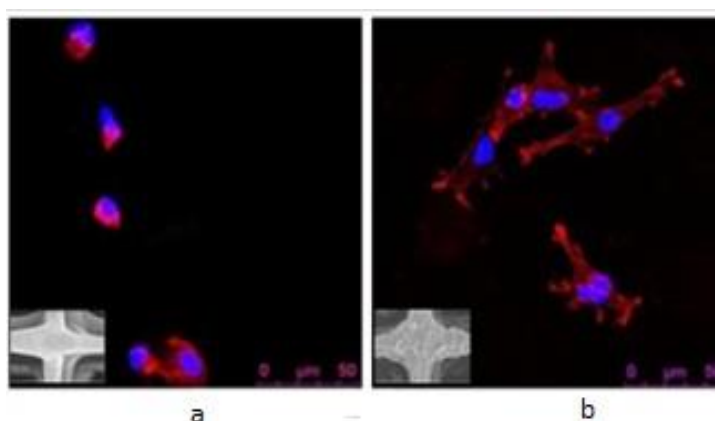
Kombinací výrobních metod lze odstranit celou řadu nedostatků, některé z nich však nadále přetrvávají a řeší se poté přímo úpravou výrobního materiálu, který je v dané situaci použit. K upravovaným vlastnostem patří hladkost povrchu, hydrofobicita nebo biodegradabilita materiálů. Mezi nejčastěji používané materiály patří polykaprolakton (dále jen PCL), který plní většinu potřebného, ale nevýhodu je například jeho hydrofobicita, což není příliš vhodné pro nasazení buněk. Bylo testováno, jaký vliv mělo pokrytí nosiče želatinou (derivátem z kolagenu).^[10] Tato volba nebyla náhodná, želatina je v tkáňovém inženýrství hojně používána a to především pro její biokompatibilitu a nízkou cenu. Pro porovnání byly vyrobeny dva nosiče bez a s želatinou. Výsledky po nanesení buněk jsou graficky zobrazeny na obrázku č. 9. Prokazují, že buňky lépe proliferovaly na scaffoldech pokrytých želatinou. Tento nárůst byl vyšší ve všech testovacích obdobích po 24, 72 i 120 hodinách. ^[12]



Obrázek č. 9: Chování buněk na pozorovaných scaffoldech [12]

Uvedené grafy na obrázku dokazují zlepšení hydrofilních vlastností u PCL lešení. Nátěr želatiny je prospěšný pro adhezi buněk, jejich proliferaci a sekreci extracelulární matrix. ^[12]

Dalším používaným materiálem je kyselina polymléčná (dále už jen PLA). Jedná se v dnešní době o velice používaný biodegradabilní polymer, který byl schválen úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro biomedicínské aplikace. Ve studii popisované v tomto odstavci byla kombinována PLA matrice s polyetylen-glykolem (dále jen PEG) a G5 (částice fosfátu kalcia). Výsledný nosič byl plně biodegradabilní, dobře porézní a měl vynikající mechanické vlastnosti. Kyselina polymléčná a PEG byla rozpuštěna v chloroformu, G5 byl použit ve formě částic a přidán do roztoku. Opět byly vyrobeny dva různé nosiče jeden bez částic fosfátu kalcia a druhý s nimi. Obě varianty prokázaly dobře definovanou strukturu s požadovanou velikostí pórů. U scaffoldu s G5 byly částice dobře začleněné a vznikl tak hrubší povrch, který podpořil buněčnou adhezi a proliferaci (obrázek č. 10) ^[13].



Obrázek č. 10: Porovnání množení buněk, tvary rostoucích buněk
(a – bez G5), (a – s G5) ^[13]

Na obrázku pořízeného na fluorescenčním mikroskopu je jasně vidět rozdíl mezi morfologií buněk na jednotlivých nosičích. Buňky ulpívající na povrchu PLA / PEG ukázaly většinou zaoblené tvary, a byly řídce rozšířeny na povrchu. V druhém případě s přidáním G5 byl pozorována daleko lepší buněčná proliferace. ^[13]

Pórovitost výsledného nosiče byla v obou případech nižší než očekávaná, ale i tak byla ucházející. U nosiče s G5 byla porosita 70% bez G5 byla 75%. Toho mohlo být dosaženo během smršťovací fáze. Je dobře známo, že nejen struktura scaffoldu, ale i povrchové vlastnosti mají zásadní význam pro nasazení a proliferaci buněk. V mnoha případech je právě jedním z hlavních problémů příliš hladký povrch vyrobeného nosiče.

U scaffoldu s G5 byla zanechána zajímavá porézní nanostruktura a po odpaření rozpouštědla byla drsnost povrchu mnohem vyšší. To přispělo k dobré adhezi buněk s jejich následnou proliferací. Přidáním částic G5 bylo dosaženo i zvýšení modulu tlaku od 8% do 35% v závislosti na struktuře scaffoldu. ^[13]

Přídavek G5 do PLA matrice odstranil nežádoucí hladkost povrchu, zvýšil kompresní modul a způsobil lepší adhezi buněk. Jeví se tedy jako jedna z možností úpravy základního materiálu pro odstranění určitých nevýhod, konkrétně přílišné hladkosti povrchu a nedostatečných mechanických vlastností. ^[13]

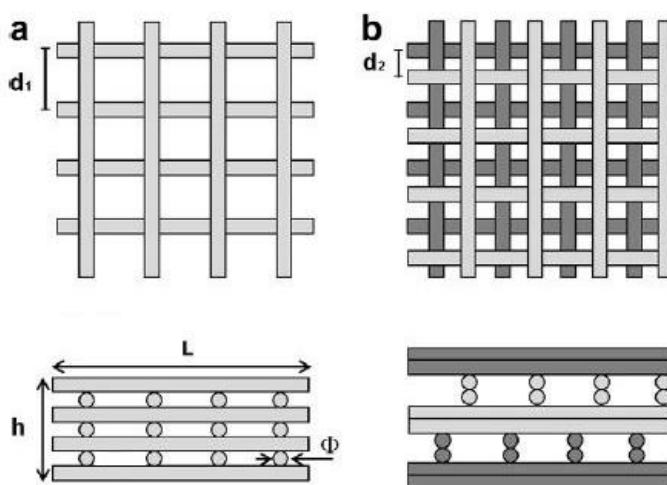
V neposlední řadě patří k úpravám materiálů výroba jejich směsí neboli kopolymerů. Dietmar W. Hutmacher a Park ve svých článcích uvádí, že nejčastěji používané materiály pro výrobu scaffoldů jsou PLA, PGA a PCL. ^[14] Popřípadě jejich kombinace. Dále se můžeme setkat s několika neschválenými polymery, jako je polyorthoester (POE), polyanhydridy, atd., které jsou zatím předmětem výzkumu. Díky kombinaci materiálů můžeme měnit jejich vlastnost podle poměru, v jakém dané polymery kopolymerujeme. ^[14]

Samotný materiál PCL degraduje relativně pomalu, ale poskytuje vysokou houževnatost. Byly tedy vyrobeny dva nosiče z různých materiálů ^[14]. Jeden z PCL druhý z kopolymeru kyseliny polyglykolové a polymléčné (dále už jen PLGA). Výsledné informace prokazují, že ani jeden z materiálů není pro nasazené buňky toxický a u buněk dále docházelo k jejich proliferaci. Ta byla o přibližně 15% lepší u PLGA. Nevýhodou kopolymeru však zůstává jeho rychlejší degradace po implantaci, což může mít za následek to, že se scaffold rozloží dříve, než se stihne vytvořit nová tkáň. Oba materiály v tomto testu prokázaly, můžou být použitelné pro výrobu buněčných nosičů. Záleží tedy jen na tom, jaký z nich bude v dané situaci vhodnější ^[14]. Podrobnější popis a rozdělení zmíněných a dalších používaných materiálů je uveden v kapitole 3.4.

2.5 Rozměrové parametry scaffoldů

Scaffoldy pro kloubní chrupavky musí plnit několik základních vlastností, jako jsou dostatečné mechanické vlastnosti, poróznost a hlavně propojenost jednotlivých pórů. Testované scaffoldy, by ale také měly mít určité základní rozměry.

Serra a Planell ve svém článku pracují se dvěma scaffoldy u nichž byly navrženy rozdílné velikosti pórů a odlišné uspořádání základní struktury (obrázek č. 11).^[13] U obou bylo dosaženo při biologických testech dobrých výsledků, a proto bylo se scaffoldy podobných rozměrů pracováno i při prováděném experimentu.

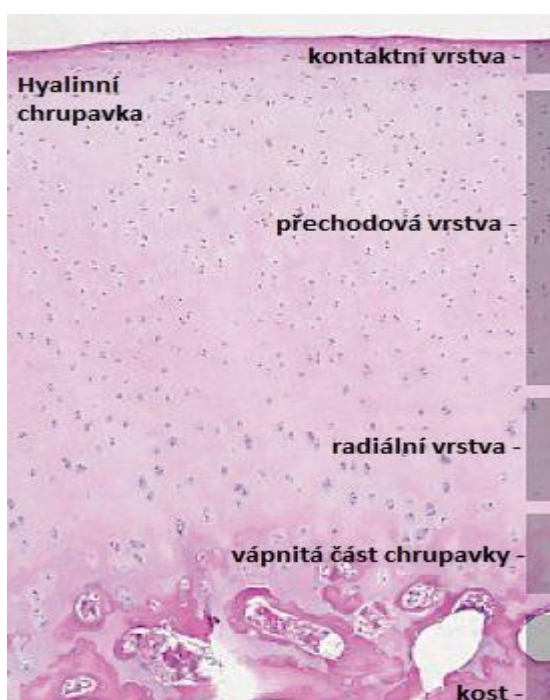


Obrázek č. 11: Rozměrové parametry scaffoldů^[13]
 $d_1 = 500 \mu\text{m}$; $d_2 = 250 \mu\text{m}$; $\phi = 200 \mu\text{m}$, $L = 12 \text{ mm}$, $h = 5 \text{ mm}$

3 Teoretická část

V této kapitole se nachází obecný souhrn informací, které byly dále využity při experimentu. První část je zaměřena na biologii původní kloubní chrupavky, dále je věnována pozornost tkáňovému inženýrství, vlastnostem kladeným na dané scaffoldy a jejich následnému biologickému testování po osazení buňkami. V závěru kapitoly jsou popsány aplikované materiály a využití výrobní technologie.

3.1 Hyalinní chrupavka



Obrázek č. 12: Histologický preparát hyalinní chrupavky [15]

Hyalinní, neboli kloubní chrupavka (obrázek č. 12) je ze všech typů zastoupena v lidském těle nejvíce. Tato sklovitá chrupavka je bílé až lehce namodralé barvy, v některých svých slabších místech je i průhledná. Vyznačuje se vysokou tvrdostí, je hladká a křehká. Jak bylo výše zmíněno, tato chrupavka se nazývá také jako kloubní a to z důvodu svého umístění a činnosti. Pokrývá kloubní hlavice, tvoří skelet hrtanu a v neposlední řadě tvoří i konce žeber. Důležitou roli hraje také při vývoji plodu a novorozenců, jelikož jeho nosný skelet je z velké části tvořen právě tímto

typem chrupavky. Základní buňky obsažené v chrupavce se nazývají chondrocyty. Jsou kruhovitěho až vřetenovitěho tvaru s ostrými výběžky, kterými se drží v mezibuněčné hmotě. Buňky se po dělení nevzdalují a zůstávají u sebe, tvořící skupiny, které se nazývají skupinami izogenickými. Skupiny chondrocytů jsou chráněny pouzdem z kolagenních vláken a extracelulární hmoty. Kolagenní vlákna i základní hmota jsou vlastním produktem chondrocytů. Vlákna se na celkovém zastoupení mezibuněčné hmoty podílí zhruba 50%, tvoří je kolageny typu II a vlákna se pojí do podoby prostorové sítě, jejíž uspořádání se odvíjí od zatížení dané chrupavky. Právě díky svému složení a architektuře je hyalinní chrupavka vhodná pro krytí hlavic kloubů u pohybových aparátů. [4] [15] [16]

Hlavním problémem kloubních chrupavek jsou požadavky, jaké jsou na ně kladeny při zatížení, jaké musí snášet. Chrupavčitá tkáň má velmi omezenou možnost regenerace. Naopak daleko snáze degradují, což vede k velkému množství kloubních onemocnění.

3.1.1 Degenerace a regenerace chrupavky

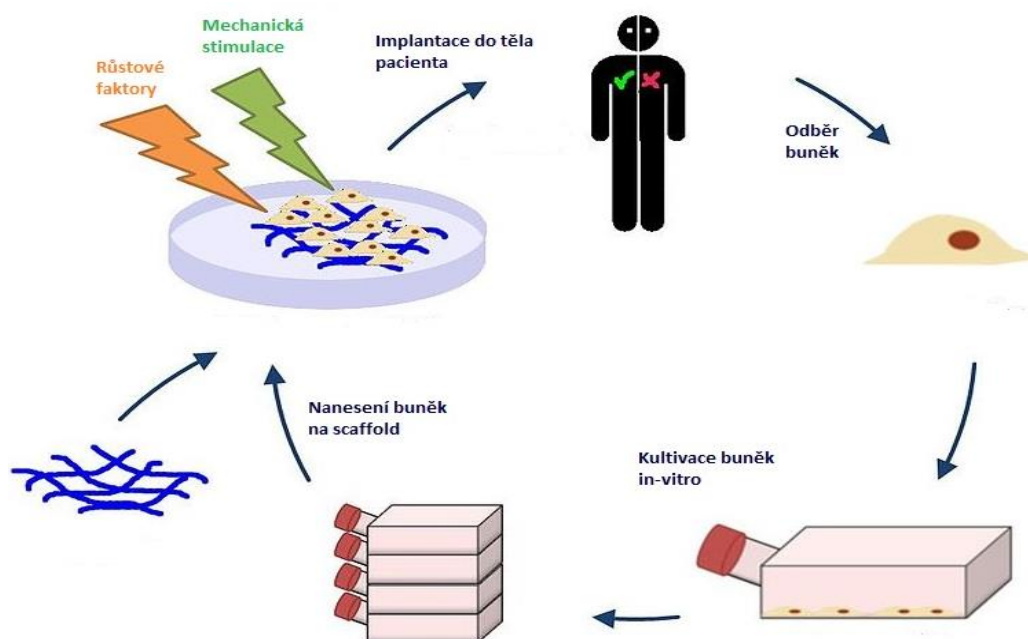
Ve srovnání s jinými tkáněmi degraduje hyalinní chrupavka daleko častěji. Nejčastější příčinou špatné funkce je zvápenatění chrupavkové matrix, kdy nejdříve začnou buňky zvětšovat svůj objem a následuje jejich zánik. U zestárých chrupavek poté můžeme pozorovat azbestovou degradaci, která vzniká vytvářením agregátů silných abnormálních fibril. Chrupavka ale nemusí pozbýt funkčnosti pouze postupným zestárnutím, může dojít i k jejímu poranění. Při zhoršení funkce chrupavky přichází na řadu její schopnost regenerace. S výjimkou chrupavek v dětském věku regeneruje poškozená chrupavka velice obtížně a často pouze částečně. Regenerační proces je omezen na perichondrium, ze kterého pronikají buňky do poškozené části a postupnou přestavbou tkáně tvoří chrupavku novou. V případě rozsáhlého poranění je chrupavka nahrazena jizvou z tuhé vazivové tkáně. Při úplném poškození kloubní chrupavky je třeba přistoupit k chirurgickému zákroku, který v dnešní době zahrnuje celkovou výměnu postiženého kloubu. Jelikož se jedná o rozsáhlejší zákrok, je snahou tkáňového inženýrství vyvinout pouze vhodný buněčný nosič, kterým se nahradí přímo sama chrupavka a postupem času se vytvoří nová. Pacient by byl tedy ušetřen větších zákroků a dlouhodobé rehabilitace. [17] [18]

3.2 Tkáňové inženýrství a požadavky kladené na scaffoldy

Tkáňové inženýrství je vědní obor, který spojuje zákonitosti a metody inženýrství s přírodními vědami za cílem vývoje biologických náhrad sloužících k obnově, zlepšení funkcí nebo náhradě disfunkčních tkání. Zabývá se vývojem a využitím různých výrobních technologií, výzkumem buněk, tkání a orgánů pro jejich nahrazení.

Proces tkáňového inženýrství (obrázek č. 13) začíná tím, že se provede štěp chondrocytů pacienta. Kultivace těchto buněk dále probíhá v laboratorních podmínkách, kde je podporována buněčná proliferace. V průběhu tohoto procesu je tvořen scaffold o požadovaných vlastnostech. Jakmile buňky dosáhnou požadovaného počtu, jsou

naneseny na připravený scaffold, kde by mělo dojít k jejich adhezi a proliferaci. Po určitém časovém úseku je nově vytvořená chrupavka umístěna přímo na postižené místo, tedy do kloubu pacienta, kde si nanesené chondrocyty za postupného rozkladu scaffoldu vytvoří nová kolagenní vlákna, mezibuněčnou hmotu a vznikne původní chrupavčitá tkáň. [4]



Obrázek č. 13: Proces tkáňového inženýrství

Aby vyráběný scaffold plnil funkci dočasné náhradní chrupavky, musí splňovat několik kritérií. Musí být plně biodegradabilní, nevyvolávat v organismu zánětlivou reakci, musí mít dobrou pórovitost a tyto póry musí být co nejlépe propojeny, aby docházelo k prorůstání buněk a dopravě živin. V několika studiích bylo řečeno, že propojení je důležitější nežli samotná pórovitost a byl i vyvrácen fakt, že potřebná pórovitost by měla být přes 70%. [2] [3] Dobré výsledky byly dosaženy i u pórovitosti kolem 56%, pokud byly póry kvalitně propojeny. Se stoupající porózitou naopak klesly mechanické vlastnosti scaffoldu. Mechanické i chemické vlastnosti jsou u nosiče dalším důležitým aspektem. [4] [2]

3.3 Buněčné testování

Testování buněčné adheze, viability, proliferace, diferenciace, migrace či apoptózy je nezbytný krok při kontrole osazeného scaffoldu buňkami. Pomáhá odhalit, jak se buňkám na scaffoldu daří, zda pronikají do jeho vnitřní struktury nebo jestli při

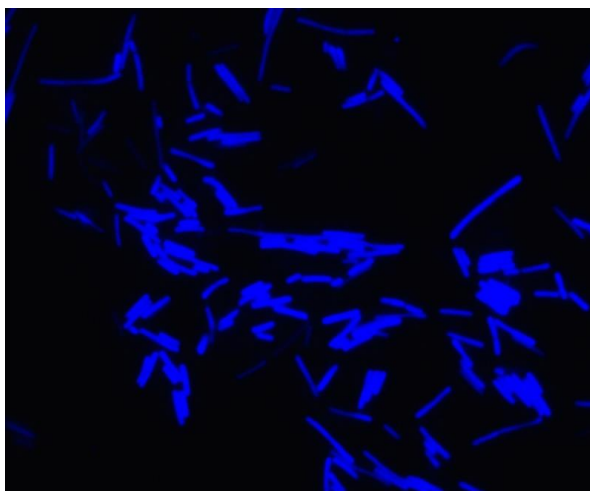
kontaktu s použitým výrobním materiálem nebyla vyvolána reakce, která by vedla k usmrcení buněk. Z pravidla se tyto testy dělí na fluorescenční a nefluorescenční. V obou odvětvích je celá řada používaných testů, tato kapitola je však zaměřena pouze na testy využitě při experimentu, tedy MTT test, fluorescenční a elektronovou mikroskopii.

3.3.1 MTT test

Tento způsob testování se řadí mezi buněčné testy viability a je založen na redukci žlutého MTT barviva (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan. Redukce probíhá na mitochondriálních membránách živých buněk. Formazan je poté rozpuštěn silným detergentem a následné fialové zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Procento živých buněk a jejich metabolická aktivita je poté určena mírou absorbance, čím je vyšší, tím je i více živých buněk. ^[19]

3.3.2 Fluorescenční mikroskopie

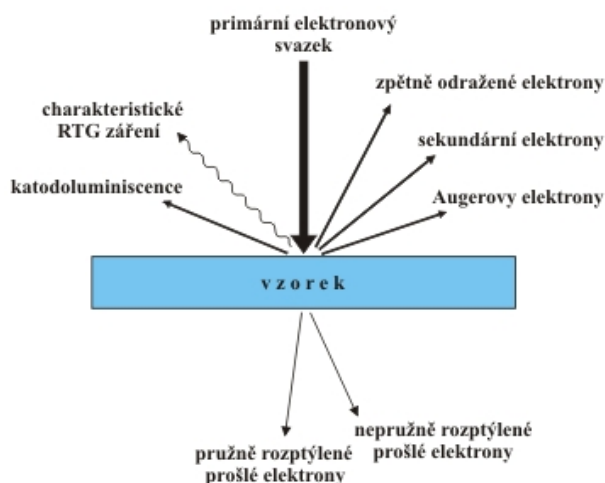
Fluorescenční mikroskopie patří mezi metody, kterými lze určit adhezi a proliferaci buněk. Jedná se o nejčastěji používanou metodu mikroskopie pro detekci specifických molekul (proteiny, lipidy, sacharidy) v buňkách bez nutnosti jejich destrukce. Účinnou látkou, jak již název napovídá je fluor, který dokáže absorbovat světlo určité vlnové délky (excitační záření) a následně emitovat světlo o jiné vlnové délce (emisní záření). Světla o různých vlnových délkách lze od sebe odlišit pomocí filtrů mikroskopu, kde poté dostáváme podobné pohledy jako na obrázku č. 14. ^[20]



Obrázek č. 14: Posouzení životaschopnosti mikrobiálních buněk fluorescenční mikroskopií

3.3.3 Elektronová mikroskopie

Tento typ mikroskopie byl využit při buněčných testech i při pořizování snímků jednotlivých povlácených mřížek před samotným osazením buňkami. Elektronový mikroskop je optický přístroj, jako je tomu u mikroskopie světelné. Místo světelného svazku se však využívá svazek urychlených elektronů elektromagnetickým polem (obrázek č. 15), obvykle jsou vybaveny elektromagnetickými čočkami a pozorovací aparát i vzorek jsou umístěny ve vakuu. Hlavním a významným rozdílem je jejich mezní rozlišovací schopnost, která je mnohem větší nežli u světelných mikroskopů (až 1.000.000x). Elektronové mikroskopy se dále dělí do dvou kategorií - rastrovací elektronové mikroskopy SEM sloužící pro analýzu povrchů a transmisní elektronové mikroskopy TEM pro analýzu vnitřní struktury. [21]



Obrázek č. 15: Schéma principu elektronové mikroskopie

3.4 Materiály použité při výrobě scaffoldu

Zvolený materiál, který chceme použít, musí plnit několik požadavků, jako je jeho biodegradabilita, nesmí být toxický vůči organismu a jeho výsledné mechanické a fyzikální vlastnosti se musí co nejvíce blížit těm, které měla původní chrupavka. Použité materiály jsou představeny v kapitolách 3.4.1 a 3.4.2.

3.4.1 Polymerní materiál MED 610

Tento materiál byl použit jako náplň do 3D tiskárny při výrobě základní nosné části scaffoldu. Jedná se materiál dodaný přímo výrobcem tiskárny, firmou Stratasys. Patří mezi biokompatibilní, ale již ne mezi biodegradabilní fotopolymery a dodává se v tuhém stavu. Vyznačuje se vysokou rozměrovou stabilitou a bezbarvou

transparentností. Je to jediný lékařsky schválený polymerní materiál, co se týče cytotoxicity, genotoxicity a podráždění, který výrobce dodává. Tento materiál je vhodný pro aplikace, které vyžadují delší kontakt s pokožkou (více než 30 dní) a krátkodobý kontakt se sliznicí (cca 24 hodin) ^[22]. Další vlastnosti uváděné výrobcem jsou vypsány v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Vlastnosti polymeru MED 610 ^[22]

MED 610	
Hustota [g/cm³]	1,17 – 1,18
Teplota skelného přechodu [°C]	52 – 54
Navlhavost [%]	1,1 – 1,5
Modul pružnosti [MPa]	2000 - 3000
Pevnost v tahu [MPa]	50 - 60

3.4.2 Polykaprolakton (PCL)

Polykaprolakton je jeden z nových a nejpoužívanějších materiálů, do kterého je z pohledu tkáňového inženýrství vkládáno mnoho nadějí z důvodu jeho vlastností. Jedná se o biodegradabilní materiál ze skupiny syntetických polymerů. Konkrétně se jedná o semikrystalický polymer s teplotou skelného přechodu kolem -60°C a teplotou tání mezi 59-64°C. Právě nízká teplota tání je jednou z nevýhod, zabraňuje totiž jeho nutné sterilizaci většinou uznaných metod, při nichž je nutné použít vyšší teploty. Polykaprolakton degraduje pomaleji a je proto využíván pro implantáty s potřebnou delší dobou přetrvání. Degradace probíhá v lidském těle enzymaticky. Polykaprolakton je možné kombinovat s dalšími materiály a tím na příklad řídit čas degradace a další vlastnosti. ^[23]

V experimentální části poté byly použity následující dva druhy PCL o různých molekulových hmotnostech, které byly zvoleny jako materiál pro výrobu nanovlákněné vrstvy prokládající jednotlivá patra scaffoldu. Oba typy byly zakoupeny od firmy SIGMA – ALDRICH, která se zabývá výrobou chemických a biochemických materiálů pro vědecký výzkum. Základní parametry PCL uváděné výrobcem jsou vypsány v tabulkách č. 3 a č 4.

Polykaprolakton o molekulové hmotnosti 45 000 g/mol (dále jen PCL 45k) se lehce zvláknuje, ale jeho biologická rozložitelnost trvá delší dobu, nežli u nižších molekulových hmotností, kde již zvláknování neprobíhá optimálně. Trendem je zkusit pracovat i s malými molekulovými hmotnostmi za cílem snížit čas degradace scaffoldů. Z tohoto důvodu byl tedy zařazen i polykaprolakton molekulové hmotnosti 14 000 g/mol (dále jen PCL 14k).

Tabulka č. 3: Vlastnosti PCL 14 000 uváděné výrobcem ^[24]

PCL 14k	
Forma dodání	vločky
Teplota tání [°C]	60
Teplota skelného přechodu [°C]	-60
Průměrná molekulová hmotnost [g/mol]	14 000
Hustota [g/mol při 25 °C]	1,146

Tabulka č. 4: Vlastnosti PCL 45 000 uváděné výrobcem ^[24]

PCL 45k	
Forma dodání	pelety
Teplota tání [°C]	56-64
Teplota skelného přechodu [°C]	- 60
Průměrná molekulová hmotnost [g/mol]	45 000
Index toku taveniny [g/10min při 80°C]	1,8

Použité materiály PCL a MED 610 nejsou jediné, kterých je v tkáňovém inženýrství využíváno, patří sem celá řada dalších syntetických i přírodních polymerních materiálů (tabulka č. 5), které jsou hojně využívány pro své specifické vlastnosti.

Tabulka č. 5: Polymerní materiály využívané tkáňovým inženýrstvím

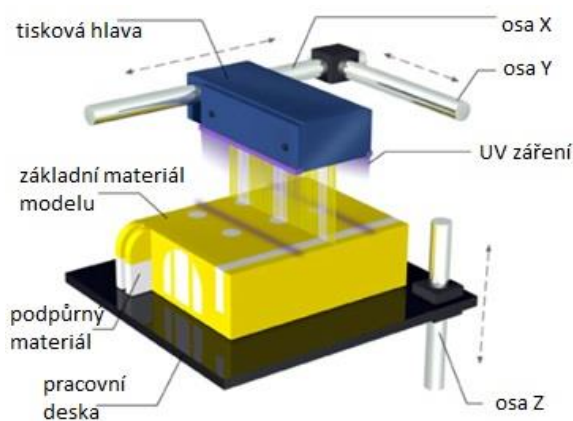
Syntetické polymerní materiály	Přírodní polymerní materiály
Kyselina hyaluronová	Kyselina polyglykolová (PGA)
Kolagen	Kyselina polymléčná (PLA)
Silk fibroin	-

3.5 Použitá výrobní zařízení

Tato kapitola je zaměřena na popsání jednotlivých výrobních zařízení, které byly následně použity při experimentu. Je zde uvedeno jaké nabízejí možnosti, jaké jsou jejich výhody, nevýhody a několik informací uváděných přímo výrobcí těchto strojů.

3.5.1 3D tiskárna Connex 500

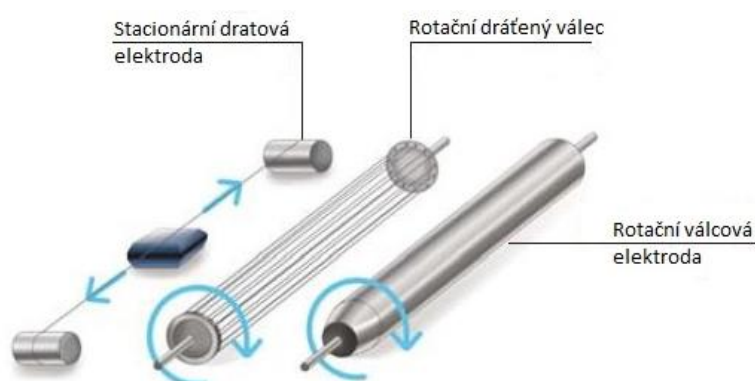
Výrobcem tiskárny typu Objet Connex 500 je společnost Stratasys, přední poskytovatel 3D tiskových systémů s pobočkami v Severní Americe, Evropě, Japonsku, Číně, Hong Kongu a Indii. Popisovaný typ je vůbec první tiskárna, která má možnost dvoukomponentního tisku a je tedy možné zhotovit model ze dvou materiálů zároveň (PoyJet Matrix). Tiskárna dovoluje tisknout až ze sto čtyř digitálních materiálů, mezi kterými jsou i polymery vhodné pro lékařské využití a zařízení tak má široké možnosti působnosti. Pracovní prostor je 500 x 400 x 200 mm a umožňuje tisk mnoha malých částí v jednom zásobníku, což bylo také při tomto experimentu využito. Jednou z dalších vlastností, která byla při výrobě scaffodlu oceněna je to, že dokáže nanášet vrstvy s přesností již od 16 μm . Při rozměrových požadavcích buněčných nosičů se jedná o velkou výhodou. Mezi nevýhody se naopak řadí například velká spotřeba materiálu při jejich výměně nebo omezení pouze na materiály dodávané přímo výrobcem tiskárny. Při tištění dutých a porézních předmětů je nutná aplikace dvou různých materiálů. První je materiál nosný, ze kterého je tištěn celý předmět podle virtuálního modelu a je doplněn o materiál podpurný, který vyplňuje póry a dutiny. Tím zamezuje zhroucení nosné konstrukce před úplným dokončením tisku. ^[25] Princip 3D tiskárny je schematicky znázorněn na obrázku č. 16.



Obrázek č. 16: Princip 3D tiskárny

3.5.2 Nanospider – INSW500U

Nanospider je přístroj pro výrobu nanovláken za pomoci vysokého napětí, který byl vyvinut Technickou univerzitou v Liberci ve spolupráci s firmou Elmarco a je jedním z nejpoužívanějších přístrojů pro průmyslovou výrobu nanovláken. Laboratoř přípravy nanovláken a nanopovrchů je vybavena strojem typu NS Production Lines 500, které představuje jedno z nejmenších produkčních zařízení, které poskytuje dostatečnou kapacitu pro laboratorní výrobu. Jedná se také o jediné zařízení, umožňující výměnu elektrodového systému a tím optimalizovat výrobní proces. [26] Volit je možné ze třech možných systémů, které jsou zobrazeny na obrázku č. 17. Pro povlákání scaffoldu při experimentu byla použita elektroda strunová (na obrázku první z leva).



Obrázek č. 17: Druhy elektrodových systémů [26]

Podrobnější provozní parametry jsou uvedeny v tabulce č. 6. U řady z nich, lze změnou dosáhnout požadovaných vlastností výstupní nanovlákněné vrstvy jako je například plošná hmotnost a tloušťka vrstvy.

Tabulka č. 6. Provozní parametry NS 500U [26]

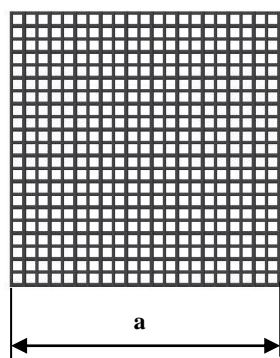
Provozní parametr	Hodnota
Počet zvlákňovacích elektrod	1
Délka zvlákňovací elektrody [mm]	500
Šířka nanovláknenné vrstvy [mm]	200 - 500
Nastavitelná výška kolektoru [mm]	130 - 280
Rychlost podkladového materiálu [m/min]	0,015 - 1,95
Průtok vzduchu [m ³ /h]	20 - 150

4 Experimentální část

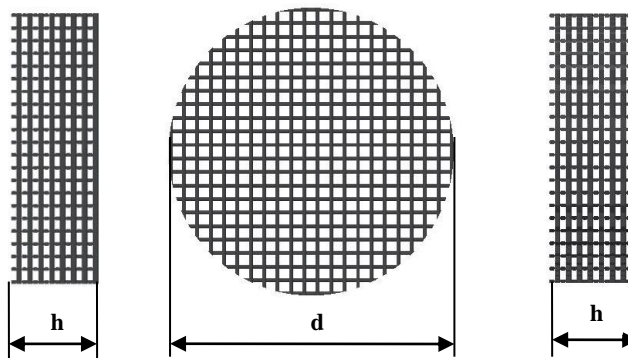
V této části práce je popsán průběh experimentu a jeho jednotlivé kroky, jak šly v časové ose postupně za sebou. Detailněji jsou v jednotlivých kapitolách popsány přesné výrobní podmínky i postupy, které byly použity a výsledky, které jimi byly dosaženy. Tyto výsledky byly dále zpracovány a vyhodnoceny. V závěru experimentální části, je na základě získaných poznatků uvedena diskuze a několik návrhů na optimalizaci.

4.1 Výroba scaffodlu základní technologií

I v tomto experimentu, jako u všech, kde je využívána metoda rapid prototypingu bylo prvním krokem navržení počítačového modelu scaffodlu, sloužícího jako předloha pro 3D tiskárnu. Účelem prvních pokusů výroby bylo zjistit, zda tiskárna dokáže vytisknout předmět tak malých rozměrů a jestli on sám poté snese další zacházení. Modelová předloha pro tisk byla vytvořena v počítačovém programu Autodesk Inventor Professional 2014. Jedná se o parametrický, adaptivní 3D modelovací program - softwarová CAD aplikace firmy Autodesk. Nakreslené návrhy jsou zobrazeny na obrázcích č. 18 a č. 19.



Obrázek č. 18: Čtvercový model
 $a = 15\text{mm}$, $h = 5\text{mm}$



Obrázek č. 19: Kruhový model
 $d = 15\text{mm}$, $h = 5\text{mm}$

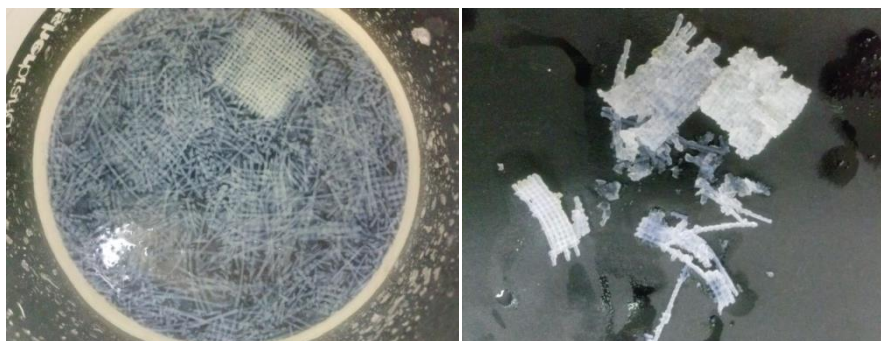
Pro první testy byl zvolen čtvercový model, to kvůli předpokládané lepší pevnosti okrajových částí a také svému jednoduššímu provedení. Jednotlivé příčky byly vzdáleny $500\text{ }\mu\text{m}$, výška příček byla $300\text{ }\mu\text{m}$, o $100\text{ }\mu\text{m}$ větší, nežli byla jejich šířka. To z důvodu, aby došlo k rozšíření pórů z bočního pohledu a tím ke zvětšení prostoru pro pronikání buněk do vnitřní struktury. V trojrozměrném pohledy měly tedy póry velikost $500 \times 500 \times 300\text{ }\mu\text{m}$.

Mechanická metoda, při které je podpora vymyta pomocí tlakové vodní pistole, nemohla být v tomto případě použita z hlediska křehkosti výrobku. Byla tedy zvolena metoda druhá, která spočívá ve vymytí podpory pomocí rozpouštědla. Použitá rozpouštědla a výsledky, které byly za jejich pomoci dosaženy, jsou uvedeny v tabulce č. 7. Při prvním testování rozpustnosti nebyl prozatím testován celý vyrobený scaffold, nýbrž pouze vzorky použitých materiálů. Zkoušky rozpustnosti probíhaly v ultrazvukové vodní lázni.

Tabulka č. 7: Testování rozpustnosti materiálů

Rozpouštědlo	Dosažené výsledky po 15min, teplota vodní lázně 45 °C
Chloroform	Viditelný rozpad podpurného materiálu.
Toulen	Minimální reakce obou materiálů.
Methanol	Minimální reakce obou materiálů.
5% kyselina octová	Částečný rozpad podpurného materiálu.
Rozpouštědlo	Dosažené výsledky po 30min, teplota vodní lázně 55 °C
Chloroform	Pokročilejší rozpad podpurného materiálu.
Toulen	Spíše pokročilejší rozpad nosného materiálu.
Methanol	Spíše pokročilejší rozpad nosného materiálu.
5% kyselina octová	Spíše pokročilejší rozpad nosného materiálu.
Rozpouštědlo	Dosažené výsledky po 45min, teplota vodní lázně 65 °C
Chloroform	Z velké části (cca 85%) podpurného materiálu, nosný materiál zůstává pevný.
Toulen	Značné nabobtnání podpurného materiálu (měkký rozpadá se), částečně ale i patrný rozpad nosného materiálu.
Methanol	Úplný rozpad nosného materiálu, minimální poškození nosného.
5% kyselina octová	Z větší části rozpad podpurného materiálu, ale nosný materiál znatelně zkrěhnul.

Na základě získaných poznatků byly provedeny testy rozpouštědel na celých scaffoldech. Z rozpouštědel byl vyřazen roztok kyseliny sírové a byl nahrazen 10% roztokem hydroxidu sodného, který se běžně používá při vymývání podpory v laboratoři rapid prototypingových technologií u rozměrnějších výrobků. Při aplikaci rozpouštědel na celý scaffold bylo ovšem dosaženo značně negativních výsledků a ve všech případech došlo k jejich úplnému rozpadu (obrázek č. 20). To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že kontaktní místa, ve kterých se jednotlivé příčky pojí, jsou velmi malých rozměrů. Byly porušeny a neposkytovaly již dále potřebnou pevnost a soudržnost. Dalším aspektem by mohlo být bobtnáním podpůrného materiálu, čímž došlo k roztržení mřížky v již zeslabených vazných bodech.



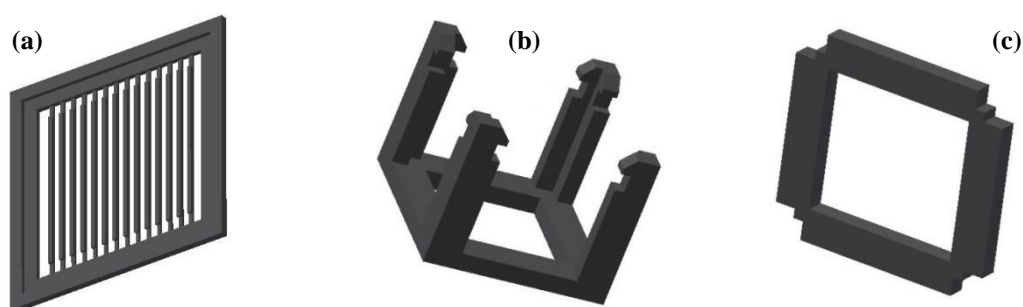
Obrázek č. 20: Rozpad mřížky scaffoldu po působení rozpouštědla

Z těchto testů vyplynulo, že běžné postupy, které jsou používány v laboratoři rapid prototypingových technologií k výrobě dutých předmětů nelze na takto málo rozměrné a křehké výrobky aplikovat. Dalším krokem bylo navržení nového postupu výroby bez podpůrného materiálu a pokud možno, již v kombinaci s nanovláknennou vrstvou.

Tisk bez podpůrného materiálu nebyl v tomto případě možný, jelikož by došlo ke zhroucení základní kostry scaffoldu před zesíťováním a ztuhnutím polymeru. Případné začlenění výroby nanovláken, aby výroba probíhala kontinuálně, bylo také zamítnuto. Při zvlákňování se pracuje vysokým napětím (cca 20 kV a více), kterým by mohlo dojít k poškození tiskárny. Další myšlenka prokládání pater scaffoldu již hotovu nanovláknennou vrstvou se také ukázala jako nevhodná z důvodu jejich mechanických parametrů a dalších kritérií, která byla v pracovním prostoru tiskárny těžko splnitelná. Byla tedy navržena metoda skládaného scaffoldu patro po patře.

4.2 Návrh skládaného scaffoldu

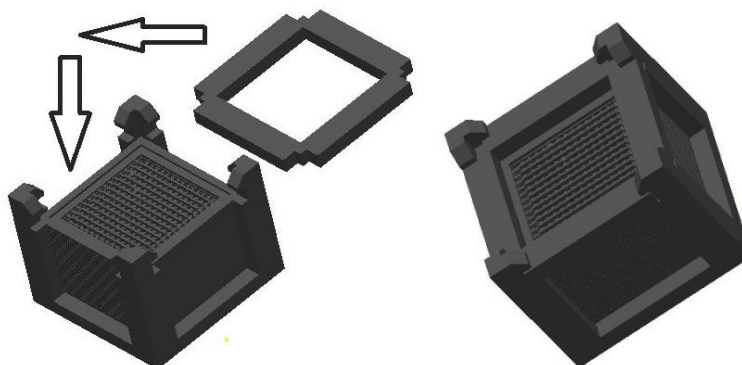
Po předchozích neúspěšných experimentech byla navržena alternativní metoda. Model scaffoldu se zde skládal z několika jednotlivých dílů a oproti předchozí metodě se objevilo několik výhod. S jednotlivými vytištěnými částmi se dalo po zhotovení lehce manipulovat, mohly být poté samostatně povlákány a složeny do podoby výsledného scaffoldu, který si pevně držel svůj tvar. Díly byly opět vymodelovány v programu Autodesk Inventor Professional 2014. Samostatné části jsou zobrazeny na obrázku č. 21. Okótované výkresy jednotlivých dílů sestavy jsou dále k nahlédnutí v příloze č. 1.



Obrázek č. 21: Samostatné části skládaného scaffoldu

(a) základní rámeček, (b) Vnější konstrukce -část A, (c) vnější konstrukce -část B

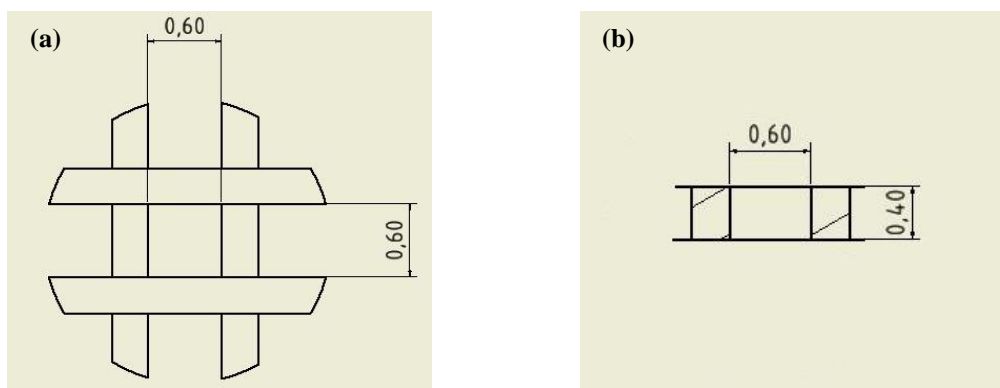
Princip skládaného scaffoldu spočíval v naskládání rámečků na obrázku č. 21 po dvaceti kusech tak, že základní příčky byly vždy kolmo orientované na příčky rámečku předchozího. Jednotlivé rámečky kolem mřížek zajišťovaly jejich pevnou a přesnou polohu. Aby nedocházelo k posuvu celých částí po sobě, byl dílec ještě vložen do vnější konstrukce, která se skládala ze dvou dalších dílů (obrázek č. 21b a 21c). Celá sestava je poté na obrázku č. 22.



Obrázek č. 22: Konečná podoba sestavy scaffoldu vyrobeného 3D tiskem

Základní část scaffoldu bez dalších podpůrných prvků, tedy pouze jádro tvořené příčkami mělo rozměry podstavy 12 x 12 mm, na výšku po navrstvení měřilo 11 mm. Toto jádro je v případě potřeby oddělitelné od nosných rámečků v krajních zeslabených místech.

Pro experiment byly navrženy dva typy základních mřížek. Mřížka s označením „600“, měla vzdálený příčky 600 μm od sebe, u mřížky „400“ byla poté vzdálenost 400 μm . Všechny ostatní rozměry zůstaly nezměněny. Detailní a okótované pohledy na vzniklé póry po navrstvení mřížek jsou zobrazeny na obrázcích č. 23 – č. 24 (kótované rozměry jsou uvedeny v milimetrech).



Obrázek č. 23: Póry mřížky „600“

(a) vrchní pohled na pór, (b) pohled z bočního řezu mřížky

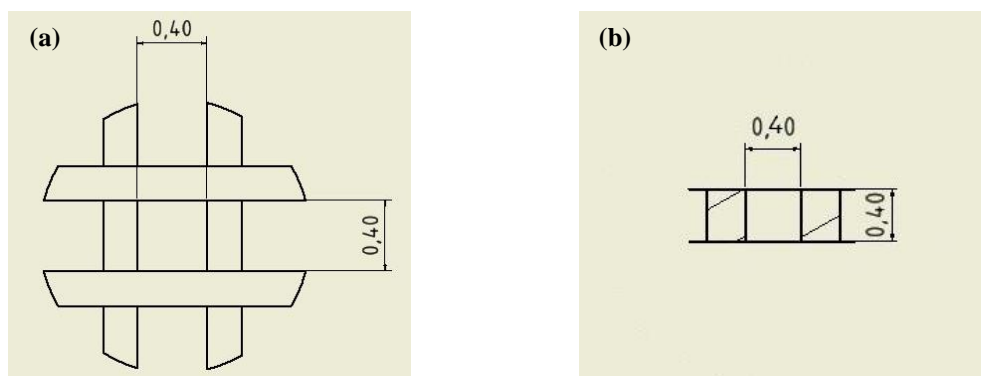
Pokud je tedy pór uvažován jako trojrozměrný objekt, má rozměry 600 x 600 x 400 μm . Při zjišťování celkové pórovitosti scaffoldu byla vypočtena hodnota 74,6 %. Tato hodnota koresponduje s pórovitostmi naměřenými v člancích uvedených v rešeršní části práce.

K výpočtu byl použit následující vztah.

$$n_c = \frac{V_p}{V_c} * 100 [\%]$$

Kde: V_p – celkový objem všech pórů

V_c – objem celého tělesa



Obrázek č. 24: Póry mřížky „400“
(a) vrchní pohled na pór, (b) pohled z bočního řezu mřížky

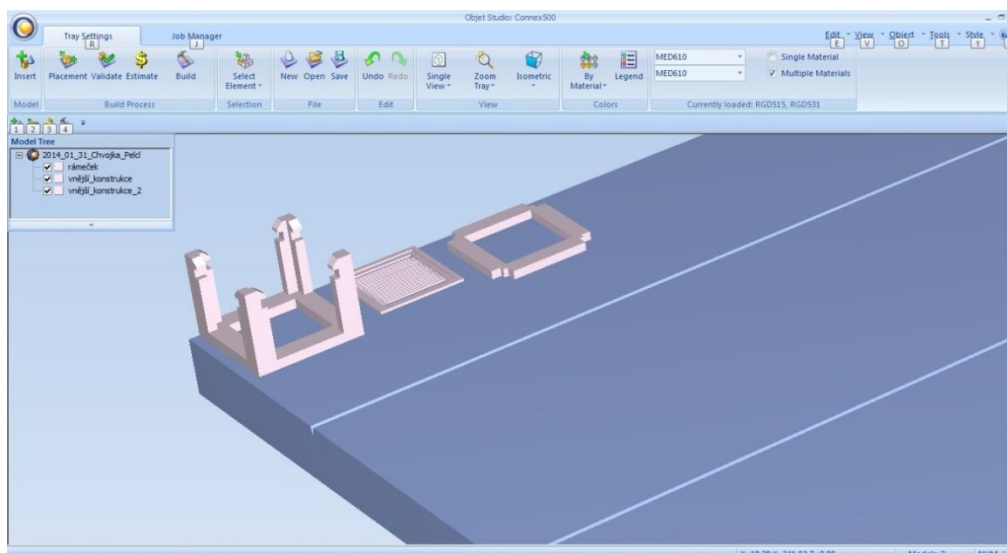
U tohoto typu mřížky s menšími vzdálenostmi příček tvořil pór prostor o velikosti $400 \times 400 \times 400 \mu\text{m}$. Podle předchozího vztahu byla opět vypočtena celková pórovitost, která v tomto případě vyšla 67,3 %.

Skutečné rozměry vytištěných dílů, se ale od modelových liší vlivem technologie tisku roztaveného polymeru při jeho vrstvení tiskařskou hlavou. Byly tedy pořízeny mikroskopické snímky mřížek a pomocí programu ImageJ proměřeny jejich skutečné rozměry, které jsou uvedeny v příloze č. 2. Bylo zjištěno, že šířka příček se z původních $300 \mu\text{m}$ průměrně zvětšila na $441 \mu\text{m}$. S tímto novým rozměrem byl proveden odhadový výpočet skutečné pórovitosti a výsledná hodnota se u obou typů mřížek snížila cca o 11 %.

4.3 Výroba skládaného scaffoldu

Výroba nosné části byla zhotovena pomocí 3D tiskárny Connex 500, která již byla popsána v kapitole 3.5.1 v teoretické části práce. V této kapitole jsou detailněji popsány podmínky a postupy výroby.

Navržený model scaffoldu (kapitola 4.2) byl převeden do formátu STP, se kterým je tiskárna schopna dále pracovat. Virtuální rozložení dílů scaffoldu bylo provedeno pomocí počítačového programu Object studio: Connex 500. Jak již bylo zmíněno, tiskárna je schopna tisknout větší množství součástí, což zde bylo zcela využito. Pohled na virtuální pracovní plochu s rozloženými díly je zobrazen na obrázku č. 25.



Obrázek č. 25: Pracovní plocha tiskárny s rozloženými modely jednotlivých dílů

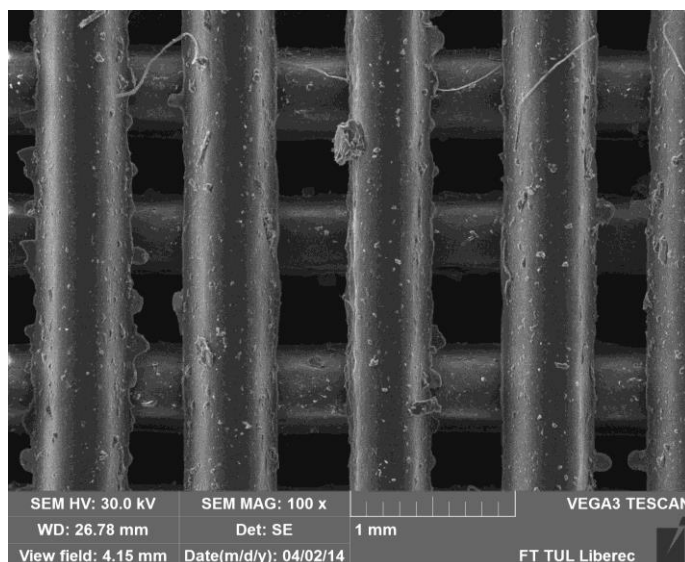
Celkem bylo vytištěno sto kusů rámečků se vzdáleností příček 600 μm a sto kusů rámečků se vzdáleností příček 400 μm . Zbylé dvě část tvořící vnější konstrukci byly vytištěny každý po padesáti kusech. K výrobě byl použit biokompatibilní polymer MED 610 popsáný v kapitole 3.4.1.

Podmínky, za kterých byly díly tištěny a pracovní parametry, které byly nastaveny u tiskárny, jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Podmínky a pracovní parametry tisku

Teplota vzduchu [°C]	21
Teplota tavení polymeru [°C]	72
Tloušťka nanášených vrstev [μm]	16
Metoda tisku	High quality
Typ podpůrného materiálu	Light

Po vytištění byl odstraněn podpůrný materiál, který vyplňoval potřebné mezery a podpíral jednotlivé díly. Mikroskopický snímek na obrázku č. 26 zachycuje mřížku scaffoldu po tomto kroku před nanášením nanovlákněné vrstvy.



Obrázek č. 26: Mřížka scaffoldu po odstranění podpůrného materiálu

Z obrázku je patrné, že odstranění podpůrného materiálu neproběhlo dokonale a na příčkách scaffoldu zůstaly drobné pozůstatky. Členitější povrch scaffoldu by neměl negativně ovlivňovat růst zachycených buněk při jeho osazení. Naopak by se zde nanesené buňky mohly lépe uchytit. Jelikož se ale nejedná o stejný materiál, jako tvoří nosnou část scaffoldu je zde riziko zánětlivé reakce a ohrožení života nasazených buněk.

4.4 Začlenění nanovláknenných vrstev

Scaffoldy vyrobené z pomoci 3D tisku se setkávají s několika nevýhodami a z toho to důvodu je kombinován s dalšími metodami. V tomto případě byl tisk kombinován s nanovláknny, kde z nich vytvořená vrstva pomáhá buňkám překonat velké póry scaffoldu. Jak toto začlenění probíhalo, je popsáno v následujících kapitolách.

4.4.1 Příprava zvlákňovacích roztoků

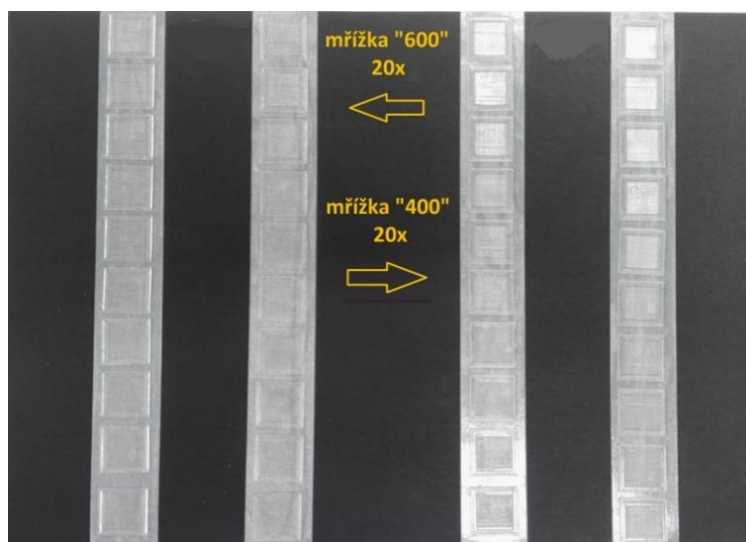
Pro zvlákňování byly namíchány dva typy roztoků (tabulka č. 9), pro přípravu prvního byl rozpuštěn PCL 45k, v druhém případě stejný polymer, ale o menší molekulové hmotnosti PCL 14k. Oba materiály i důvod jejich použití je popsán v kapitole 3.4.2.

Tabulka č. 9: Zvláknovací roztoky

x	Roztok PCL 14k		Roztok PCL 45k	
Koncentrace roztoku [%]	16		30	
Rozpouštědlový systém a použitá rozpouštědla	8	chloroform	8	chloroform
	1	ethanol	1	ethanol
	1	kyselina octová	1	kyselina octová

4.4.2 Nanosení nanovláknenné vrstvy na scaffold

K povláknnění jednotlivých pater nosiče bylo využito zařízení Nanospider pro tvorbu nanovláken, který je blíže popsán již v kapitole 3.5.2. Nejdříve bylo nutné připevnit mřížky na podkladovou odtahovou textilií, kde dochází k zachycení vzniklých vláken. Pro zjednodušení byly tedy jednotlivá patra scaffodlu přilepeny pomocí oboustranné lepicí pásky na černý papír, který byl poté stejným způsobem přichycen k podkladové odtahové textilií. Na papír bylo přilepeno dvacet kusů od každého typu mřížky (obrázek č. 27) a pro každý zvláknovací roztok bylo připraveno po jednom archu papíru.



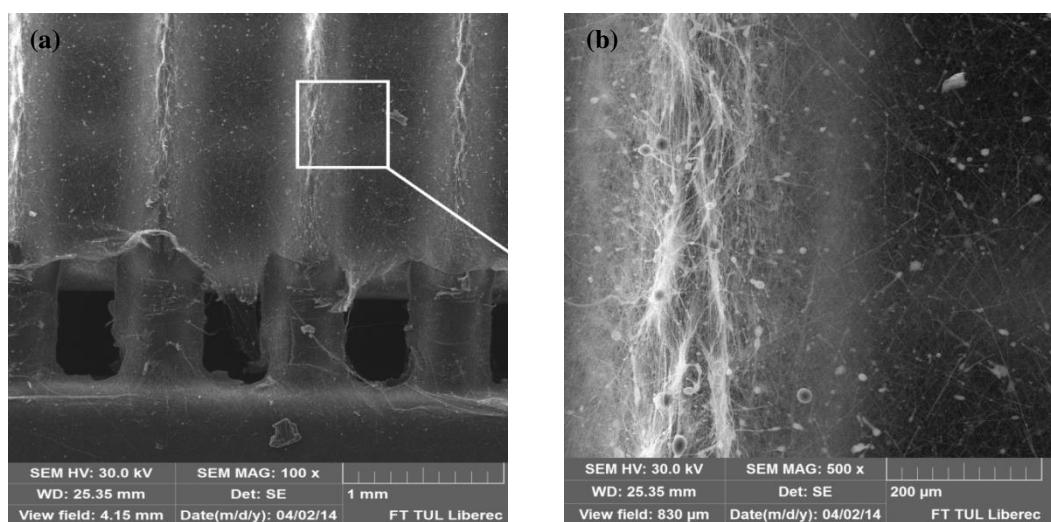
Obrázek č. 27: Jednotlivé mřížky připravené na povláknnění

Podmínky, při kterých byla vytvořena potřebná nanovláknenné vrstva a parametry nastavené na lince Nanospider jsou uvedeny v následující tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Podmínky a parametry zvlákňování

Teplota vzduchu uvnitř linky [°C]	24,4
Vlhkost vzduchu uvnitř linky [%]	23,5
Odtah podkladové textilie [mm/min]	14,2
Napětí na zvlákňovací elektrodě [kV]	55,9
Napětí na sběrném kolektoru [kV]	- 11,9
Vzdálenost elektrod [mm]	161,9

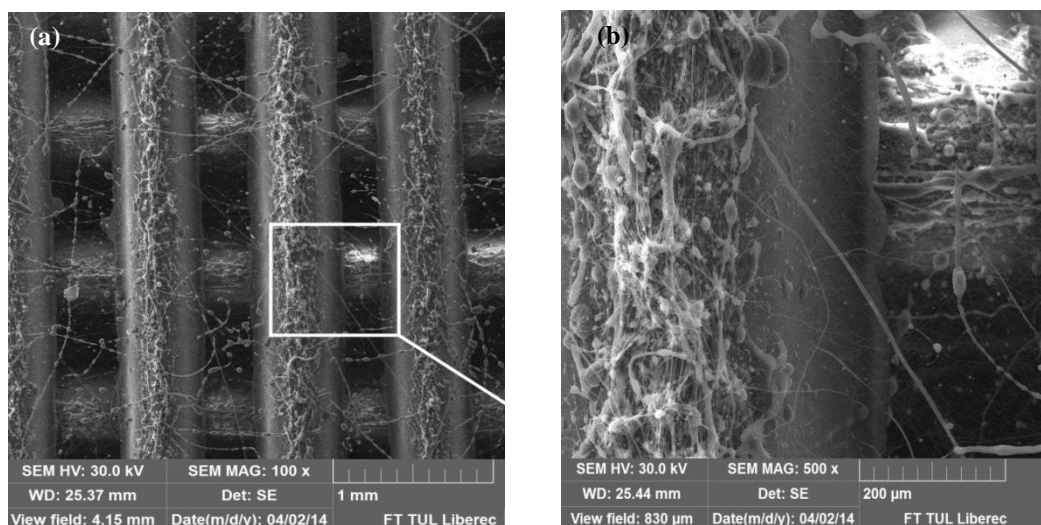
Při zvlákňování roztoku z PCL 45k byla vytvořena celistvá, dobře soudržná vláknenná vrstva, která bez problémů překryla připevněné mřížky (obrázek č. 28). Průměrná hodnota tloušťky vláken této vrstvy činila 208 ± 47 nm, průměrná plocha pórů byla odhadnuta na $1,12 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$. Obě hodnoty byly naměřeny v programu ImageJ z detailních mikroskopických snímků. Vrstva vykazovala dobrou soudržnost i při další manipulaci s povláknnými díly. Jelikož se jednalo o hustou vrstvu, byla ponechána pouze přímo na středech mřížek tak, aby mezi ní a vnějším rámečkem vzniklo místo pro průchod média s nasazenými buňkami (obrázek č. 28). Mřížky opatřené nanovláknennou vrstvou byly opět poskládány do původního navrženého tvaru scaffoldu.



Obrázek č. 28: Elektronový snímek povláknného scaffoldu
(a) zvětšení scaffoldu 100x, (b) detail vyznačeného místa - zvětšení 500x

Stejného efektu ovšem nebylo dosaženo při zvlákňování PCL 14k. Vzniklá vláknenná vrstva byla značně nesoudržná a s nízkou mechanickou pevností. V oblasti mřížek nedošlo dokonce k žádnému zachycení vláken.

Z tohoto důvodu byl tedy namíchán nový zvlákňovací roztok z PCL 14k ovšem s jiným rozpouštědlovým systémem. Byl použit systém 9:1 bez kyseliny octové, tedy devět dílů chloroformu a jeden díl ethanolu. Vytvořená vláknenná vrstva bylo opět nesoudržná a lámavá, bylo již ale pozorováno zachycení vláken na jednotlivých mřížkách (obrázek č. 29). Následkem absence kyseliny octové, která snižuje průměr vláken a tím i jejich mechanickou pevnost. Ultra jemná vlákna ovšem nejsou v tomto případě tolik důležitá a vlákna o větších průměrech naopak poskytnou vyšší pevnost potřebnou k překonání mezer mezi příčkami scaffoldu. Průměrná hodnota tloušťky vláken této vrstvy činila 220 ± 54 nm, průměrná plocha pórů byla odhadnuta na 20 ± 16 μm^2 . Obě hodnoty byly naměřeny v programu ImageJ z detailních mikroskopických snímků. Takto povláknný scaffold bylo tedy již možné použít pro biologické testování.



Obrázek č. 29: Elektronový snímek povláknného scaffoldu
(a) zvětšení scaffoldu 100x, (b) detail vyznačeného místa - zvětšení 500x

V obou případech zvlákňování, jak u PCL 14k tak i u PCL 45k došlo k překrytí prostor mezi jednotlivými příčkami a tím vznikla oblast pro uchycení a proliferaci buněk. V případě PCL 45k je na mikroskopických snímcích viditelné, že vnikla hustá a celistvá vláknenná vrstva s malým počtem defektů, které se z velké části objevily v místech, kde vlákna dopadala na příčky scaffoldu. V těchto místech jsou také vlákna nanesena v silnější členité vrstvě a jsou zde orientována ve směru příček. Od krajů této oblasti nad příčkami, jsou poté vlákna orientována směrem k příčce sousední. Vláknenná

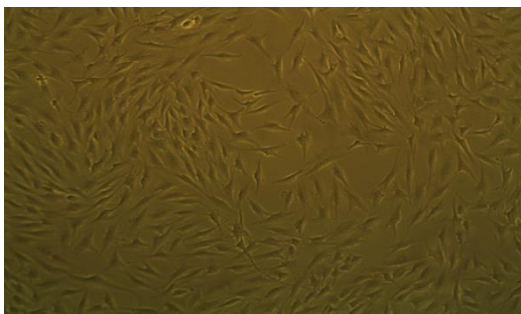
vrstva z PCL 14k již nebyla tak celistvá, bylo zde zachyceno menší množství vláken a bylo také pozorováno velké množství perličkových defektů a vláken s většími průměry. Opět se ale objevil efekt s větší plastickou vrstvou na jednotlivých příčkách s vlákny orientovanými v jejich směru. Plastická vrstva vznikla patrně z důvodu záporně nabitého kolektoru u Nanospideru, čímž došlo i k nabití samotného scaffoldu. Očekával se u ní však kladný dopad na adhezi a proliferaci buněk směrem do středu scaffoldu. Parametry obou vláknenných vrstev jsou k nahlédnutí v příloze č. 3.

4.5 Biologické testování scaffoldu

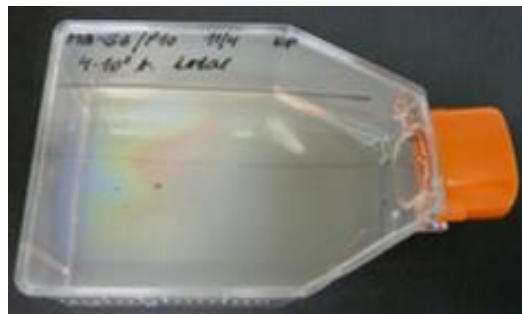
Scaffold jehož výroba je popsána v předchozích kapitolách 4.3 a 4.4 splňoval všechny potřebné parametry a mohl být podroben biologickému testování. Jeho výsledné podoby bylo dosaženo kombinací obou potřebných metod, scaffold měl svůj jasný vytištěný tvar a pomocí nanovláknenné vrstvy bylo vytvořeno prostředí pro buněčnou kultivaci. Pro zjištění, zda bude takto vyrobený scaffold pro buněčný život opravdu vhodný byly provedeny testy v biologické laboratoři na KNT TUL. Postup a průběh buněčného testování je dále popsán v následujících kapitolách. Podrobné postupy všech dílčích kroků, které bylo v biologické laboratoři třeba provést a materiály, které byly použity, jsou uvedeny v příloze č. 4.

4.5.1 Příprava a kultivace buněčné kultury

Pro tento experiment byly použity lidské osteoblasty MG 63 (obrázek č. 30). Zmražené buňky byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37° a dále kultivovány v 15 ml média EMEM (Eagle's minimal Essentials medium) ve kterém bylo obsaženo 10% FBS (Fetal bovine serum – část krevní plasmy) a 1% antibiotik v kultivační lahvičce o ploše dna 75 cm² (obrázek č. 31). Lahvička s buněčnou suspenzí byla po dobu kultivace uložena v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).



Obrázek č. 30: Uchycené a narostlé buňky MG 63 na dně kultivační lahvičky (zvětšeno 100x)



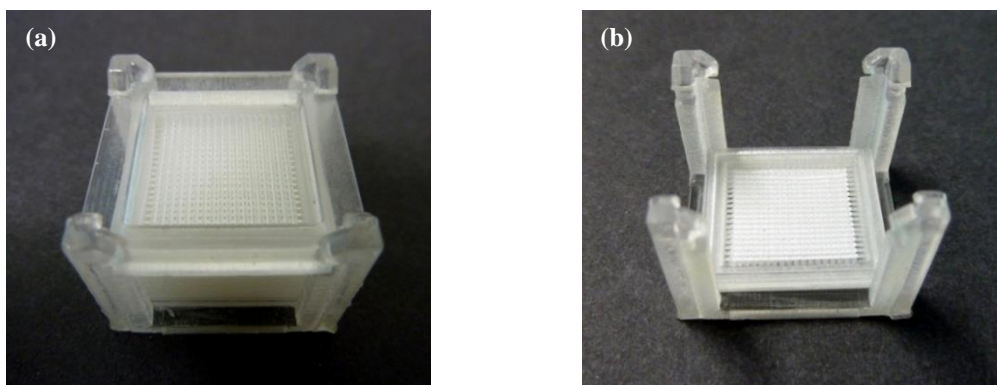
Obrázek č. 31: Kultivační lahvička (75cm²)

Do doby, než mohly být buňky nasazeny na scaffold probíhala jejich kultivace. Buňkám bylo po tuto dobu dvakrát týdně měněno médium EMEM a buňky byly také dle potřeby pasážovány. Pasážováním buněk se rozumí jejich přenesení do čerstvého živného média za účelem snížení jejich koncentrace a podpoření exponenciálního růstu. U buňky byly průběžné pozorovány pod světelným mikroskopem a v okamžiku, kdy porostly více jak 70% plochy dna kultivační lahvičky, bylo možné překročit k pasážování, aby nedošlo jejich úmrtí. Z kultivační lahvičky bylo odsáto vyčerpané médium, buňky byly opláchnuty sterilním PBS (phosphate-buffered saline – fosfátový pufr, pH 7,4) a dále byly přidány 2-3 ml trypsinu (trávicí enzym dvanácterníku), jehož působením dochází k oddělení buněk ode dna lahvičky. Po uvolnění buněk ode dna následovala inaktivace trypsinu přidáním 6 – 8 ml média EMEM. Pomocí Bürkerovy komůrky proběhlo určení počtu buněk v 1ml. Podle této hodnoty probíhalo další nasazení do nových kultivačních lahviček (75 cm²), aby výsledná koncentrace buněk v lahvičce byla $2 - 4 \cdot 10^5$ buněk. Po dobu mezi pasážováním a výměnou média byly lahvičky uloženy v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

Buňky byly nasazeny na testované scaffoldy 25. den od jejich rozmrazení. Za tuto dobu proběhlo celkem pět pasáží a bylo také pětikrát vyměněno médium EMEM. V průběhu buněčné kultivace MG 63 probíhala příprava testovaných scaffoldů před jejich osazením. Průběh této přípravy je podrobněji popsán v následující kapitole 4.5.3.

4.5.2 Příprava testovaných scaffoldů

Během kultivace buněk MG 63, byly připraveny vzorky scaffoldů pro buněčné testování. Z důvodu objemnosti vyrobených scaffoldů a potřeby většího počtu vzorků pro konečné testování byly experimenty provedeny pouze na několika vrstvách, ne na celých, původně navržených scaffoldech (obrázek č. 32). Testovaná část se skládala celkem ze čtyř vrstev vytištěných mřížek proložených třemi nanovláčnými vrstvami. Tato část byla pro lepší manipulovatelnost a uchování pevné pozice mřížek ponechána ve vnější kostře scaffoldu.



Obrázek č. 32: Příprava scaffoldu

(a) snímek celého navrženého scaffoldu, (b) testovaná část scaffoldu

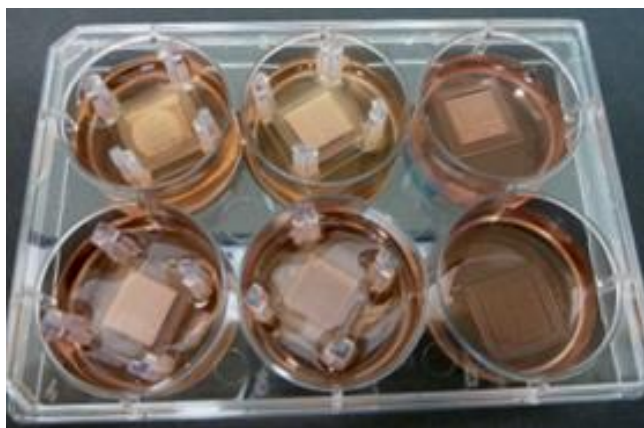
Takto upravených scaffoldů na obrázku č. 32b pro biologické testování bylo celkem připraveno dvacet čtyři kusů, viz následující tabulka č. 11.

Tabulka č. 11: Zastoupení testovaných vzorků

x	PCL 45k	PCL 14k
Mřížka „400“	6x	6x
Mřížka „600“	6x	6x

4.5.3 Osazení scaffoldu buňkami

Po páté pasáži byly buňky nasazeny na připravené scaffoldy. Prvním krokem byla sterilizace testovacích scaffoldů. Vzorky byly sterilizovány 70% ethanolem, ve kterém byly ponořeny po dobu třiceti minut a dále pětkrát promyty sterilním PBS. Nasazení buněk probíhalo podobným způsobem, jako jejich pasážování popsané v kapitole 4.5.2 s tím rozdílem, že po zjištění celkového počtu buněk v 1ml nebyla suspenze přenesena kultivační lahvičky, ale do sterilních kultivačních destiček o šesti jamkách ($6 \times 9,60 \text{ cm}^2$), ve kterých již byly připraveny vysterilizované scaffoldy (obrázek č. 33). Celkem bylo nanášeno na každý scaffold 5×10^5 buněk v celkovém objemu 5ml.



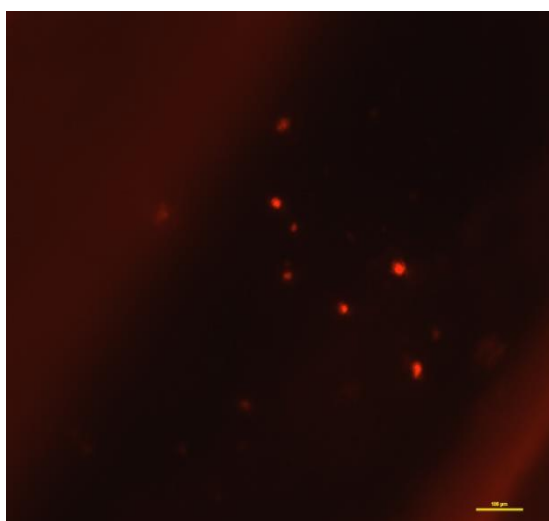
Obrázek č. 33: Kultivační destička (75 cm²) s osazenými scaffoldy

4.5.4 Testy buněčné viability a adheze

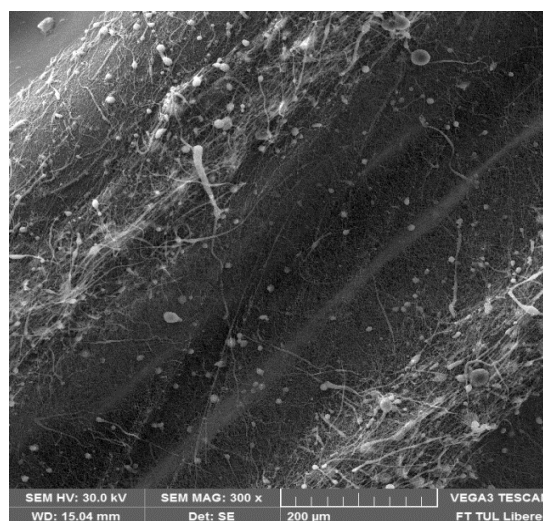
Po osazení scaffoldů buňkami následovalo jejich testování, pomocí něhož mělo být zjištěno, zda navržená konstrukce a materiál podporuje buněčnou adhezi a následnou proliferaci. Buněčné testování probíhalo v několika dnech, mezi tyto dny patří den první, třetí, sedmý a čtrnáctý. V našem případě byl z důvodu menšího počtu vzorků vyřazen první testovací den a byl pouze mikroskopicky v kultivačních destičkách ověřen stav buněk. Další testovací dny byla již využita fluorescenční a elektronová mikroskopie. Pro fluorescenční mikroskopii byly vzorky fixovány vymraženým ethanolom a obarveny propidium iodidem od firmy Sigma Aldrich. Pro elektronovou mikroskopii byly vzorky fixovány 2,5% glutaraldehydem, promyty v PBS, poté vysušeny ethanolovou řadou (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) a finálně pozlaceny 5 nm vrstvou Au na přístroji (Quantum - Q150R-ES). Výsledky zaznamenané v testovacích dnech jsou uvedeny v následující tabulce č. 12. Během testování byly osazené scaffoldy uchovávány v inkubátoru a dvakrát týdně bylo měněno kultivační médium EMEM.

Tabulka č. 12: Výsledky testovacích dnů

1. den	Pomocí světelného mikroskopu (cca 12hod po nasazení) bylo zjištěno, že buňky jsou životaschopné. Toto potvrdila i barevná změna kultivačního média, která značí, že buňky čerpají přidané živiny.
3. den	Tento den byly vzorky analyzovány fluorescenční a elektronovou mikroskopií. Od prvního dne však nebylo médium buňkami prakticky spotřebováno, což značilo jejich úmrtí. To bylo následně potvrzeno mikroskopií. Uvnitř scaffoldu bylo nalezeno pouze několik již mrtvých buněk (obrázek č. 34 a č. 35).
7. den	Sedmý testovací den byly vzorky taktéž mikroskopovány pod fluorescenčním a elektronovým mikroskopem. V obou případech se ale znovu potvrdilo, že buňky již nejsou životaschopné a naskytly se obdobné snímky jako předchozí testovací den.
14. den	Tento den byla z důvodu předchozích výsledků vyřazena fluorescenční mikroskopie a byly pouze pořízeny snímky z elektronového mikroskopu. Aby bylo zjištěno, jak materiál odolal čtrnáctidennímu působení kultivačního média (obrázky č. 36 a č. 37).



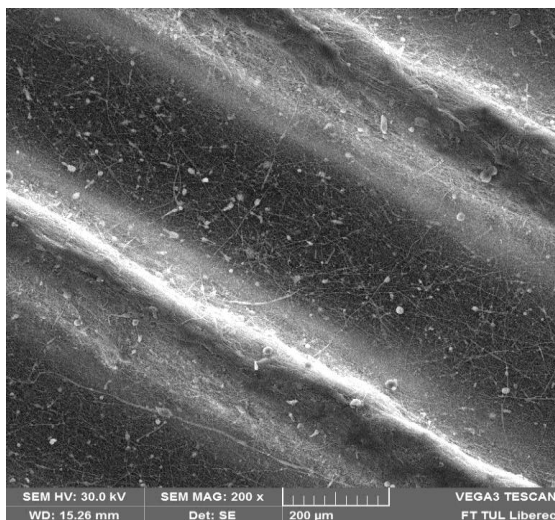
Obrázek č. 34: Snímek z fluorescenční mikroskopie (3. testovací den, PCL 45k, mřížka „600“, 100x)



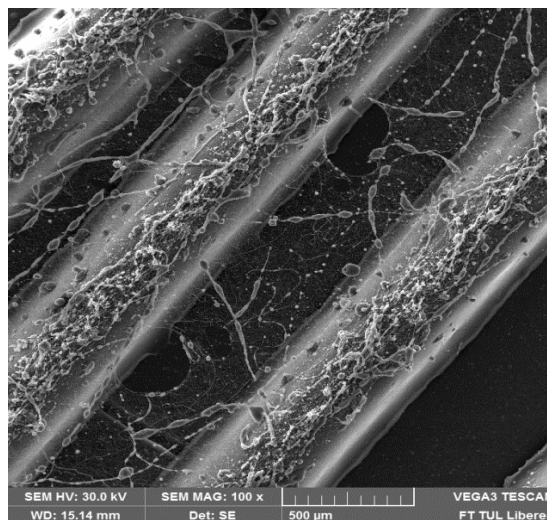
Obrázek č. 35: Snímek z elektronové mikroskopie (3. testovací den, PCL 45k, mřížka „600“)

Na obrázku č. 34 jsou viditelné pouze jádra mrtvých buněk, které se zachytily v nanovlákněné vrstvě a nebyly odsáty společně s kultivačním médiem. Tento snímek alespoň dokazuje, že struktura scaffoldu umožnila buňkám proniknout i do jeho středu, kde se usadily na nanovlákněné vrstvě. Snímek na obrázku č. 35 pořízený elektronovým mikroskopem neodhalil žádné pozůstatky buněk. Snímky z dalších testovacích dnů jsou k nahlédnutí v příloze č. 5.

Po 14 dnech kdy byly scaffolds ponořeny v kultivačním médiu byly pořízeny snímky pomocí elektronové mikroskopie. U mřížek, kde byl použit PCL 45k byla vláknenná vrstva celistvá a při osazování ani testování nebyla nijak výrazně poškozena (obrázek č. 36). Naopak na mechanicky méně odolné vrstvě z PCL 14k bylo zjištěno mnoho defektů a mezi některými příčkami chyběla vláknenná vrstva úplně (obrázek č. 37). Defekty mohly být způsobeny manipulací se scaffolds nebo jejich bobtnáním pozorovaným při sterilizaci ethanolem.



Obrázek č. 36: Snímek z elektronové mikroskopie (14. testovací den, PCL 45k, mřížka „600“)



Obrázek č. 37: Snímek z elektronové mikroskopie (14. testovací den, PCL 14k, mřížka „600“)

4.5.5 Testování toxicity materiálů

Úmrtí buněk mohlo mít několik příčin. Mohlo dojít například ke kontaminaci při předchozí manipulaci s buňkami, ale jelikož k úmrtí buněk došlo u všech osazených scaffoldů bylo pravděpodobnější, že pro buňky mohl být toxický některý z použitých materiálů. V dalším kroku testování byl tedy v kultivačních destičkách každý materiál osazen buňkami samostatně a následně byla sledována jejich adheze a proliferace. Výsledky v několika časových intervalech jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13. Výsledky testování toxicity materiálů

x	MED 610 (mřížka)	Podpurný materiál (výplň)	PCL 14k * (vlákenná vrstva)
24hod po osazení	- buňky životaschopné - koncentrace buněk 40%	- buňky životaschopné - koncentrace buněk 40%	- buňky životaschopné koncentrace buněk 40%
30hod po osazení	- buňky životaschopné - koncentrace buněk 50%	- odumírání buněk - uvolňování buněk ze dna lahvičky	- buňky životaschopné - koncentrace buněk 50%
48hod po osazení	- odumírání buněk - koncentrace buněk 30%	- opětovná proliferace buněk - z 50% porostlé dno kultivační lahvičky	- buňky životaschopné - koncentrace buněk 80%
72hod po osazení	- úplné odumření buněk	- proliferace buněk - koncentrace buněk 80%	- buňky životaschopné, celé dno porostlé (prerůstání buněk)

* Z důvodu již dřívějšího úspěšného užívání PCL 45k byl testován pouze PCL 14k

Během prvního dne pozorování potvrdilo životaschopnost buněk na všech třech materiálech, buňkám bylo následně vyměněno médium a kultivační destička byla vložena zpět do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po třiceti hodinách však již bylo pozorováno odumírání buněk v komůrkách s podpurným materiálem. Další materiály MED 610 ani PCL 14k život buněk nijak negativně neovlivňovaly.

Čtyřicet osm hodin po osazení se situace změnila, přeživší buňky na podpurném materiálu začali znovu proliferovat, zatím co u buněk nasazených na MED 610 bylo pozorováno odumírání. Buňky na PCL 14k proliferovaly bez obtíží dále. U všech vzorků opět proběhla výměna kultivačního média a byly vloženy do inkubátoru. Po třech dnech bylo zjištěno úplné odumření buněk v jamkách s materiálem MED 610, u zbylých dvou materiálů pokračovala proliferace buněk bez vážnějších obtíží.

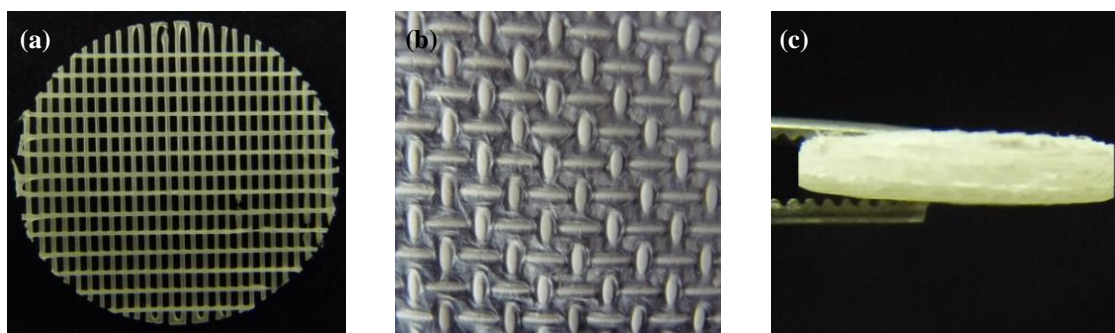
Bylo tedy dokázáno, že nedošlo k pochybení při manipulaci s nasazovanými buňkami, ale jejich nekrózu nejdříve způsobil materiál podpurný a následovně polymerní materiál MED 610.

4.6 Testování druhého typu scaffoldu

Vzhledem k neúspěšnému biologickému testování z důvodu použití nevhodného materiálu, byl dodatečně otestován druhý typ scaffoldu vyrobený z jiných materiálů a jinou technologií. Typ této technologie je uveden v kapitole 2.3.1 a dále ji podrobněji ve svých člancích popisují Kim ^[7] nebo Park ^[8].

4.6.1 Výroba scaffoldu

Materiál použitý pro tento typ scaffoldu byl pouze PCL 45k, ze kterého byla vyrobena jak nosná část 3D tiskem, tak i nanovláknenná vrstva zhotovená na lince Nanospider. Roztok pro výrobu vláknenné vrstvy byl připraven rozpuštěním PCL 45k v systému 9:1 (9 – chloroform, 1 – ethanol). Rozdíl od technologie popisované v kapitole 2.3.1 byl ten, že výroba neprobíhala kontinuálně, ale vláknenná vrstva a jednotlivé vytištěné mřížky byly zhotoveny zvlášť. Následně byly ručně spojeny vrstvy po vrstvě, až byl dosažen požadovaný tvar výsledného scaffoldu (obrázky č. 38).



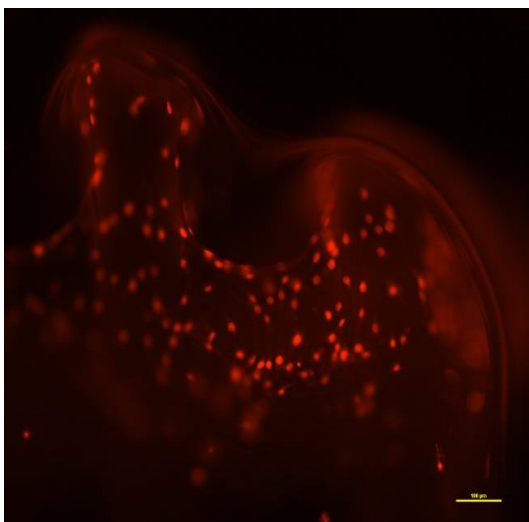
Obrázek č 38: Pojené části scaffoldu a jeho výsledná podoba
(a) mřížka vyrobená 3D tiskem, (b) vzorovaná vláknenná vrstva, (c) výsledná podoba scaffoldu

4.6.2 Biologické testování scaffoldu

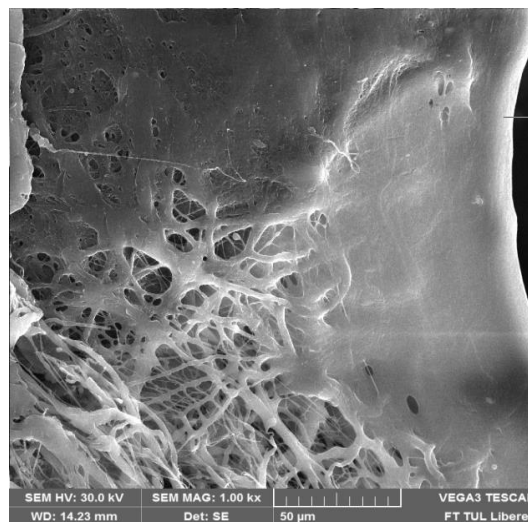
Biologické testování scaffoldů probíhalo totožně, jak je popsáno v kapitole 4.5. V této kapitole jsou proto uvedeny pouze výsledky, jakých bylo u experimentů s druhým typem scaffoldů dosaženo.

Nasazení buněk proběhlo shodně, jako u předchozích scaffoldů. Byly použity lidské osteoblasty MG 63 a nasazeny na scaffoldy v koncentraci 1×10^5 buněk v jedné jamce kultivační destičky. V průběhu testování bylo u osazených scaffoldů třikrát týdně měněno médium EMEM a vzorky byly uchovávány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

První testovací den byly vzorky zkontrolovány pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie. Potvrdilo se, že se buňky uchytily na scaffold a jsou životaschopné. Snímky na obrázcích č. 39 a č. 40 potvrzují adhezi živých buněk na nanovláknenné vrstvě. Buňky se z velké části nacházely v okrajových částech scaffoldů.

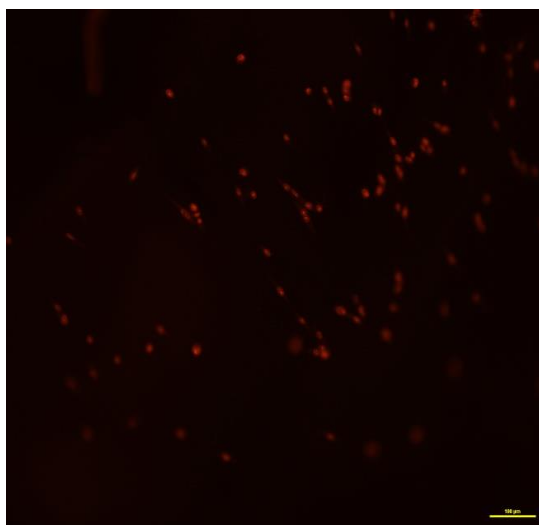


Obrázek č. 39: Snímek z fluorescenční mikroskopie (okrajová část scaffoldu, zvětšeno 100x)

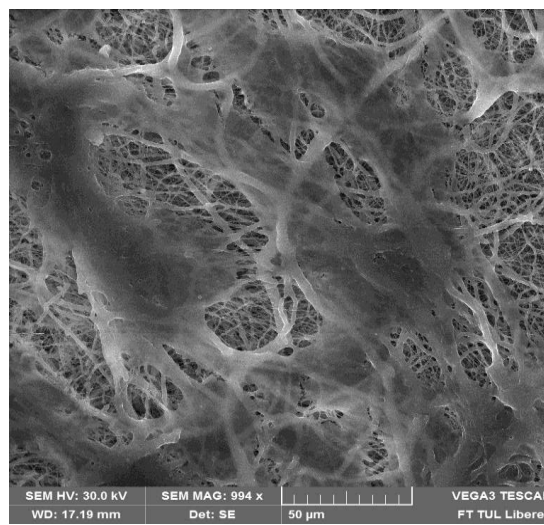


Obrázek č. 40: Snímek z elektronové mikroskopie

Třetí testovací den byly vzorky taktéž mikroskopovány pod fluorescenčním a elektronovým mikroskopem (obrázek č. 41 a č. 42). Opět se potvrdila životaschopnost nasazených buněk, které již proliferovaly z okrajových částí scaffoldu více ke středu vnitřní struktury.

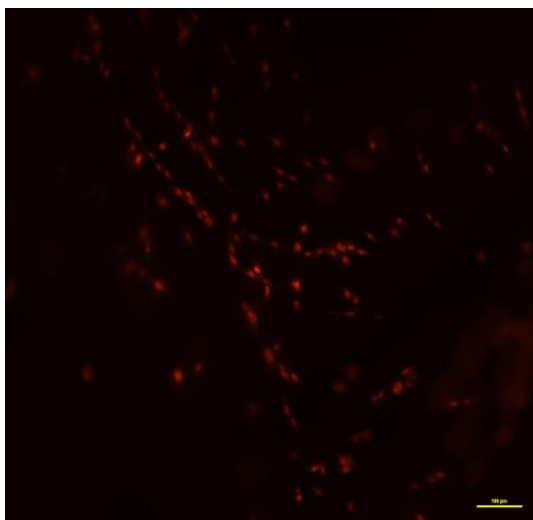


Obrázek č. 41: Snímek z fluorescenční mikroskopie (vnitřní část scaffoldu, zvětšeno 100x)

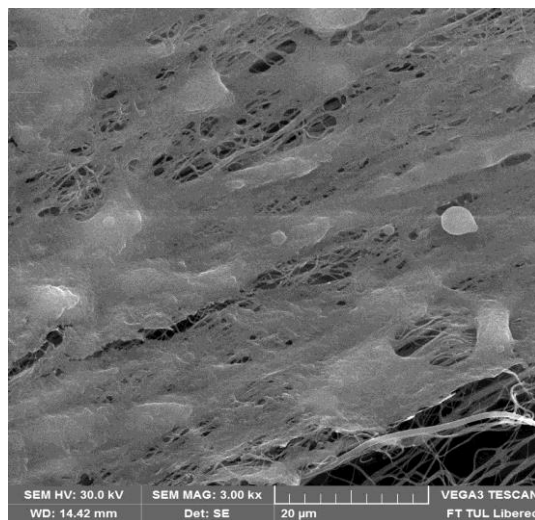


Obrázek č. 42: Snímek z elektronové mikroskopie

Sedmý testovací den bylo opět provedeno vizuální hodnocení adheze a viability za pomoci fluorescenční a elektronové mikroskopie (obrázek č. 43 a č. 44). Jako v předchozích dnech byla potvrzena buněčná proliferace. Buňky byly více rozrostlé a to i ve směru do středu struktury scaffoldu.

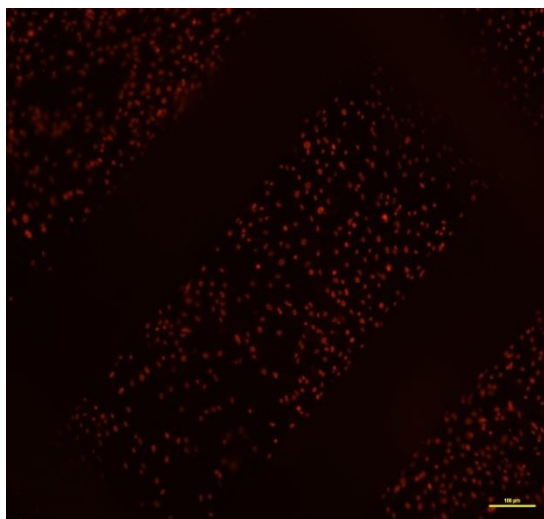


Obrázek č. 43: Snímek z fluorescenční mikroskopie (vnitřní část scaffoldu, zvětšeno 100x)



Obrázek č. 44: Snímek z elektronové mikroskopie

Čtrnáctý testovací den bylo provedeno poslední pozorování oběma typy mikroskopií (obrázek č. 45 a č. 46). Znovu se prokázalo, že nově zvolený typ scaffoldu po osazení buňkami podporuje jejich adhezi, následnou proliferaci a nijak neohrožuje viabilitu buněk.

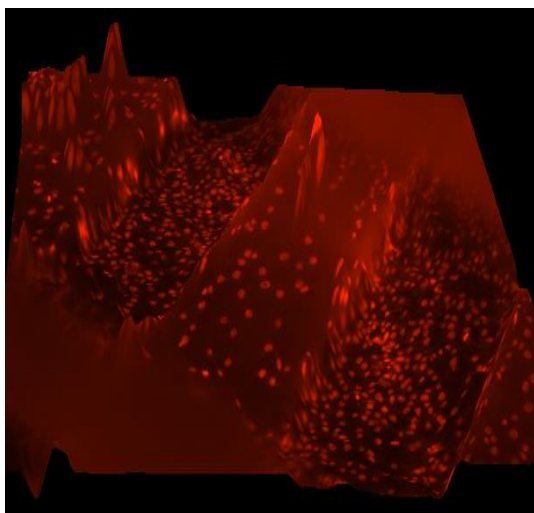


Obrázek č. 45: Snímek z fluorescenční mikroskopie (vnitřní část scaffoldu, zvětšeno 100x)

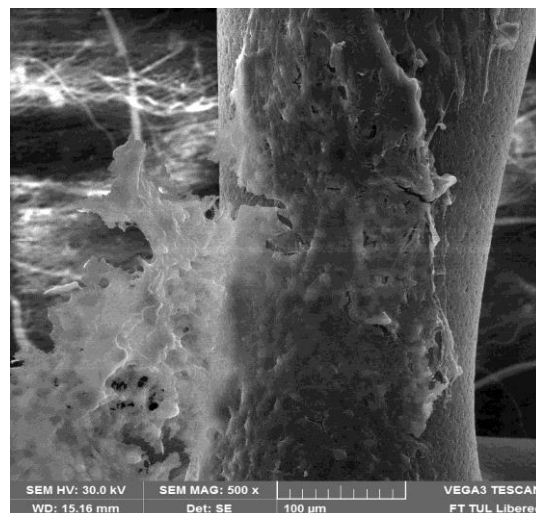


Obrázek č. 46: Snímek z elektronové mikroskopie

Pomocí fluorescenčního mikroskopu Eclipse Ti (Nikon), byl nasnímán pozorovaný vzorek v několika vrstvách ve směru osy Z. Následně byl z těchto snímků v programu NIS Elements, zhotoven celistvý proostřený obraz a vytvořen následující snímek (obrázek č. 47). Na snímku je patrné, že buňky porůstají i podpůrnou mřížku. Nález buněk na mřížce byl potvrzen i elektronovou mikroskopií (obrázek č. 48).

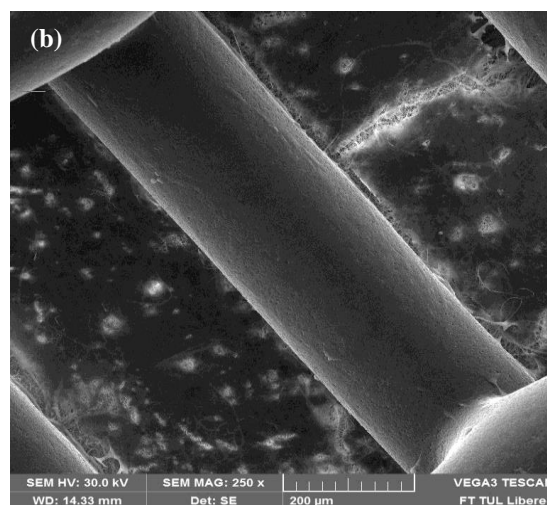
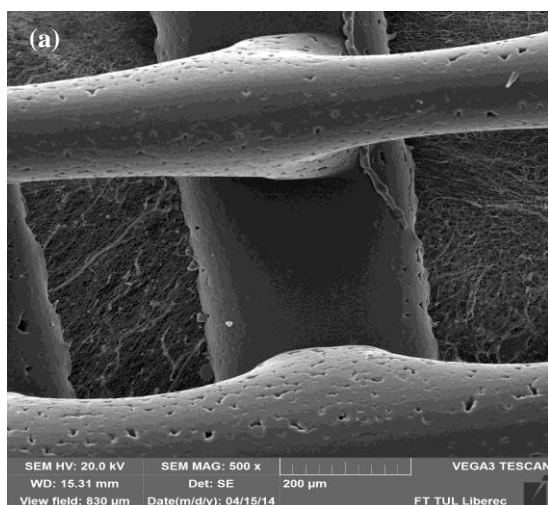


Obrázek č. 47: 3D snímek z fluorescenční mikroskopie



Obrázek č. 48: Snímek z elektronové mikroskopie

Na závěr jsou na obrázku č. 49 zobrazeny snímky z elektronové mikroskopie scaffoldu před osazením a čtrnáctý testovací den po osazení buňkami. Na snímcích je patrné, jak adherované buňky následnou proliferací překryly vláknennou strukturu celistvou vrstvou. Další mikroskopické snímky pořízené při biologickém testování jsou k nahlédnutí v příloze č. 6.



Obrázek č. 49: Porovnání elektronových snímků scaffoldu před a po osazení buňkami
(a) Snímek scaffoldu před osazením, (b) Snímek scaffoldu čtrnáctý den po osazení

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo za pomoci 3D tisku v kombinaci s nanovláknny připravit vhodný scaffold pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky. Dobrých výsledků bylo dosaženo metodou skládaného scaffoldu. Výrobkem byl scaffold s vhodnými vlastnostmi a jednotlivá patra bylo možné proložit nanovláknennou vrstvou, která poskytla prostředí pro proliferaci nasazených buněk.

Při porovnání výsledků dosažených v této práci s výsledky a názory v několika citovaných publikacích [6][7][8] lze potvrdit, že danou kombinací metod je možné vyrobit scaffold pro nahrazení poškozené kloubní chrupavky. I přes to, že se konkrétní postup výroby lišil od postupů publikovaných, měl výsledný scaffold srovnatelné vlastnosti s těmi, které byly autory publikací hodnoceny kladně a doporučeny k dalšímu testování.

Odlišnosti ve způsobu výroby sebou přinesly několik výhod i nevýhod. Použitým typem tiskárny bylo možné tisknout díly malých rozměrů ve velkém počtu. U modelů takovéto velikosti je ale nutné počítat se změnou rozměrů výsledného výrobku vůči rozměrům navrženým (viz kapitola 4.2). Využitím možnosti tisku více částí v jednom cyklu byla dosažena určitá efektivita výroby, kterou podpořilo i zapojení linky Nanospider umožňující povlákňení většího počtu dílu najednou v porovnání s jehlovým zvlákňováním. Přesto se patrně jednalo o postup časově náročnější s porovnání s kontinuálním způsobem výroby.

Použitím Nanospideru, kde je při zvlákňování používán záporně nabitý kolektor došlo i k nabití samotných částí scaffoldu, díky čemuž se objevilo charakteristické uspořádání vláken a vytvoření plastické vrstvy v místech nad příčkami mřížek (obrázky č. 32 a č. 33). Podle mého názoru se jedná o přínosný efekt. Plastická vrstva by měla podpořit adhezi nanesených buněk a jejich následnou proliferaci směrem do středu scaffoldu, což částečně potvrdily i snímky z fluorescenční mikroskopie pořízené při biologickém testování. V oblastech příček se také uchytilo větší množství vláken, než se orientovalo mezi sousedními příčkami, kde vznikla jemnější vrstva. Z mého pohledu se opět jedná o výhodu, jelikož hrubší místa nad příčkami poskytnou vlákenné vrstvě lepší mechanické vlastnosti a jemnější struktura mezi příčkami poté může dovolit i částečný prostup buněk. V těchto místech tedy nebude vrstva plnit funkci buněčného síta a měla by podpořit buněčnou migraci a proliferaci. Efekt byl pozorován u obou použitých

materiálů jak PCL 45k, tak i PCL 14k. Pro ověření, zda je scaffold vhodný pro růst buněk bylo provedeno biologické testování, které se ovšem nezdařilo a nasazené buňky po čtyřiaadvaceti hodinách nejevily známky života. Dodatečné testy prokázaly, že buňky se byly schopné se dostat až do středu scaffoldu, kde se zachytily na nanovlákněné vrstvě. Větší počet buněk byl zaznamenán na scaffoldech s vrstvou tvořenou PCL 45k. Důvodem bylo poškození vrstvy z PCL 14k kvůli nízkým mechanickým vlastnostem nízkomolekulárního polymeru.

Architektura scaffoldu tedy byla navržena vhodně, ale množství polymerních materiálů vhodných pro lékařské účely dodávaných výrobcem tiskárny bylo omezeno a nebylo možné vybrat vhodnější materiál, protože ho výrobce nedodává. Takovýto scaffold by nemohl být pacientovi implantován, pokud by byl použit materiál MED 610. Z důvodu nezdařeného biologického testování byl na závěr pro průkaznost přínosu kombinace použitých metod ještě otestován alternativní typ scaffoldu vyrobeného z prokazatelně netoxického materiálu PLC 45k. Scaffoldy z tohoto materiálu dosáhly při závěrečném biologickém testování dobrých výsledků a plně podporovaly buněčnou adhezi a proliferaci i do středu 3D struktury.

Závěrečný experiment prokázal, že zvolená kombinace metod je vhodná k výrobě scaffoldu pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky. Ale z výsledů plyne, že technologie musí být doplněna o vhodný výběr materiálu. V tomto ohledu je moje doporučení směřováno spíše na výrobce 3D tiskáren, aby zvážili rozšíření sortimentu dodávaných materiálů. Myslím, že by se jednalo o možnost výrobců expandovat do nového a perspektivního oboru a dát již tak atraktivní technologii rapid prototypingu další rozměr a možnosti.

V prvních krocích tvorby této práce se zdálo, že výroba tkáňového nosiče nebude nijak obtížná záležitost. Poté však několik technických omezení ve výzkumných laboratořích ukázalo, že se nebude jednat o jednoduchý úkol. I přes občasné nezdary ale potvrdily provedené experimenty, že kombinace 3D tisku s nanovláknem poskytuje dobrou možnost výroby tkáňových nosičů s potřebnými vlastnostmi a ukázaly, že publikovaný kontinuální způsob výroby [6][7][8] není jediným možným směrem. Dále byla potvrzena důležitost vhodného výběru materiálů pro výrobu scaffoldů a odhalena špatná zpracovatelnost polymerního materiálu PLC 14k.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byl navržen postup výroby tkáňových nosičů pro implantáty kloubní chrupavky. Tkáňový nosič byl vyroben novým a odlišným způsobem, nežli je často publikováno v odborné literatuře.

K výrobě scaffoldu byla využita 3D tiskárna Connex 500 a zvláknovací výrobní linka Nanospider – 1NSW500U. I přes odlišnost postupu výroby a volby výrobních zařízení od dosavadních technologií byl výsledkem nosič s vhodnými vlastnostmi pro další biologické testování. Ve snaze snížit biodegradabilitu tkáňových nosičů byly vyrobeny dva typy scaffoldů. Podkladové materiály vytvořené 3D tiskárnou, byly povlákány nanovláknennou vrstvou z polykaprolaktonu o rozdílných molekulových hmotnostech.

Závěrečné biologické testování však odhalilo špatnou volbu základního materiálu, který by pro případnou implantaci do těla pacienta nebyl vhodný. Dále nízkou mechanickou pevnost polykaprolaktonu o menší molekulové hmotnosti, pomocí něhož nebylo možné vytvořit vhodný prostor pro adhezi a proliferaci buněk.

Přínosnost kombinace 3D tisku a nanovláknenných vrstev byla následně potvrzena otestováním alternativního typu tkáňového nosiče z netoxického materiálu a mechanicky vhodnější nanovláknennou vrstvou. Nový typ nosiče podpořil buněčnou adhezi a proliferaci i ve vnitřní struktuře bez jakéhokoliv negativního dopadu na život buněk.

Bylo potvrzeno, že struktura vytvořena skládáním jednotlivých částí vyrobených danou navrženou kombinací lze připravit vhodný scaffold pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky. Takovýto způsob zhotovení tedy může být v budoucnu jednou z hlavních cest při výrobě tkáňových nosičů.

Použitá literatura

- [1] Stratasys [online] 25/01/2014, [cit. 10/03/2014]. Dostupné z: <http://www.stratasys.com/resources/rapid-prototyping>
- [2] Dietmar W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, č. 21, 2000, str. 2529 -2543
- [3] Ing. Pavel Hájek: Příručka pro výuku RP technologií, VOŠ a SPŠ Ždár nad Sázavou, 2006
- [4] Prof. RNDr. David Lukáš, CSc. a kol.: *Lékařské textilie 2. díl*, Asociace inovačního podnikání ČR, Praha 1, 2008
- [5] Prof. RNDr. David Lukáš, CSc. a kol.: Physical principles of electrospinning, Katedra netkaných textilií, TUL, Liberec, 2006
- [6] Su A. Park, Hyo Joo Kim, Su Hee Lee, Fabrication of Nano/Microfiber Scaffolds Using a Combination of Rapid Prototyping and Electrospinning Systems, *POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE*, 2011
- [7] Geun Hyung Kim, JoonGon Son, SuA Park, WanDoo Kim, Hybrid Process for Fabricating 3D Hierarchical Scaffolds Combining Rapid Prototyping and Electrospinning, *Macromolecular Journals*, č. 29, str. 1577–1581, 2009
- [8] Suk Hee Park, Taek Gyoung Kim, Development of dual scale scaffolds via direct polymer melt deposition and electrospinning for applications in tissue regeneration, *Science Direct*, č. 4, str. 1198–1207, 2008
- [9] Tao Xu, Kyle WBinder, Mohammad Z Albanna, Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications, *Biofabrication* č. 5, 2012
- [10] Thomas Billiet, Elien Gevaert: The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability, *Biomaterials*, č. 35, str. 49 – 62, 2014

- [11] J. Y. Tan & C. K. Chua & K. F. Leong, Fabrication of channeled scaffolds with ordered array of micro-pores through microsphere leaching and indirect Rapid Prototyping technice, Biomed Microdevices, 2013
- [12] Chih-Hao Chen, Jyh-Ping Chen and Ming-Yih Lee, Effects of gelatin modification on rapid prototyping pcl scaffolds for cartilage engineering, Journal of Mechanics in Medicine and Biology, č. 5, 2011, str. 993–1002, 2011
- [13] T. Serra, J. A. Planell, M. Navarro, High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology, Acta Biomaterialia, 2012
- [14] So Hee Park, Dae Sung Park, Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA, 2012
- [15] Disertační práce, MUDr. David Starý, Využití kmenových buněk v léčbě defektu kloubní chrupavky, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 2009
- [16] Renate Lüllman-Rauch: Taschenlehrenbuch Histologie, Georg Thieme Verlag KG, Sttutgatr, Germany, 2009
- [17] Václava Konrádova, Jiří Uhlík a Luděk Vajner: Funkční histologie. 2. vydání, Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 2, 2000
- [18] L. Carlos Junquera: Základy histologie, Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 2, 1997
- [19] Laboratoř experimentální medicíny [online], [cit. 15/03/2014]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- [20] Mgr. Jan Černý Phd., Fluorescenční mikroskopie, Fluorescenční mikroskopie, Oddělení vývojové biologie, Katedra fyziologie živočichů, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 2007
- [21] Fyzikální ústav, Akademie věd ČR [online] 2010, [cit. 29/3/2014]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [22] Stratasys, [online] 2014, [cit. 10/03/2014]. Dostupné z: <http://www.stratasys.com/materials/polyjet/bio-compatible>

[23] Katedra netkaných textilií [online] 04/12/2013, [cit. 10/02/2014]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/web/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=258&Itemid=36

[24] Sigma – Aldrich, [online] 2014, [citace] 07/02/2014. Dostupná z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=Product%20Name&term=Polycaprolactone&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&focus=product&lang=en®ion=CZ>

[25] Stratasys, [online] 2014, [cit. 12/03/2014]. Dostupné z: <http://www.stratasys.com/3d-printers/design-series/precision/objet-connex500>

[26] Elmarco, [online] 2013, [citace] 15/03/2014. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/produkty/ns-produkcni-linka-500/>

Seznam příloh

Příloha č. 1 – Okótované části skládaného scaffoldu

Příloha č. 2 – Skutečné rozměry vytištěných mřížek

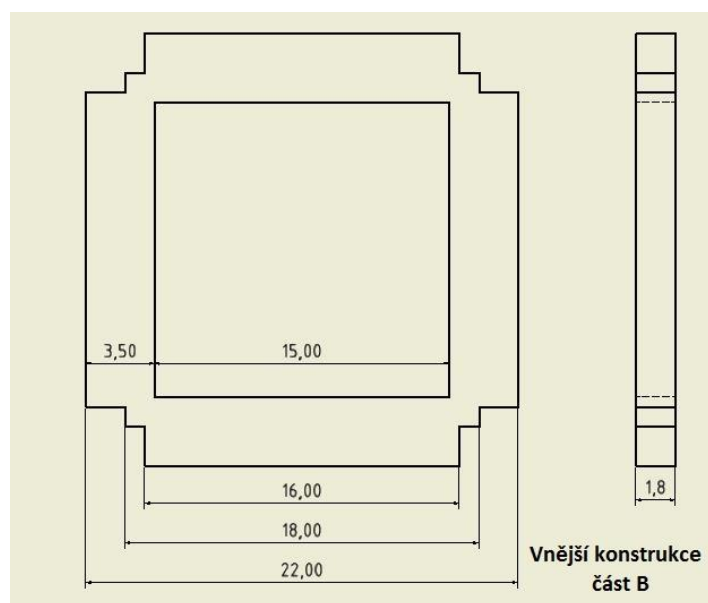
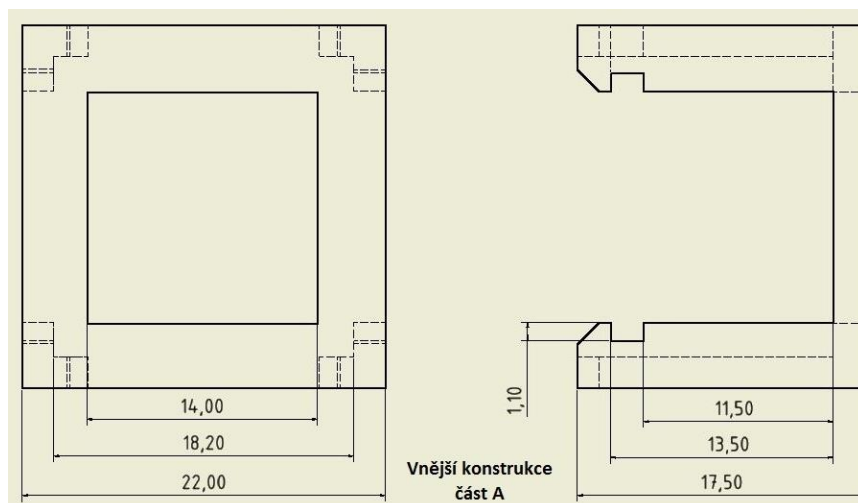
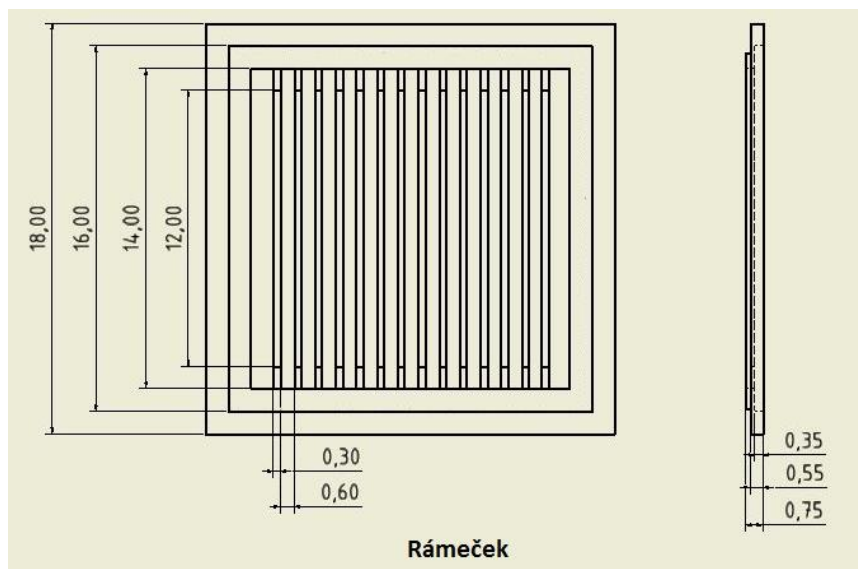
Příloha č. 3 – Parametry nanovláknenných vrstev

Příloha č. 4 – Materiály a postupy biologického testování

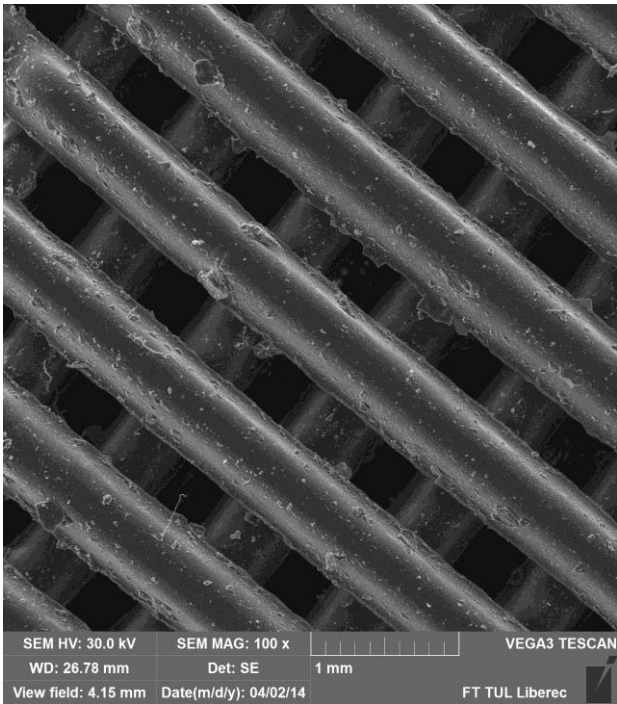
Příloha č. 5 – Mikroskopické snímky z biologického testování - I

Příloha č. 6 – Mikroskopické snímky z biologického testování - II

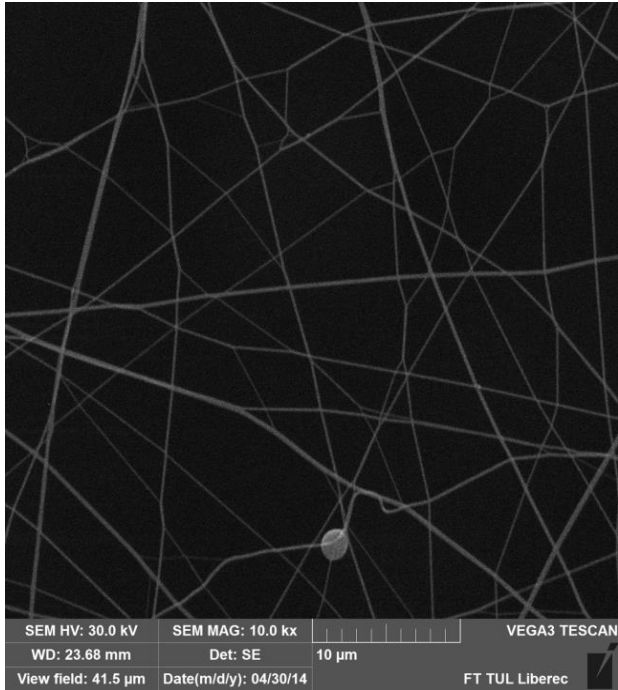
Příloha č. 1- Okótované části skládaného scaffoldu

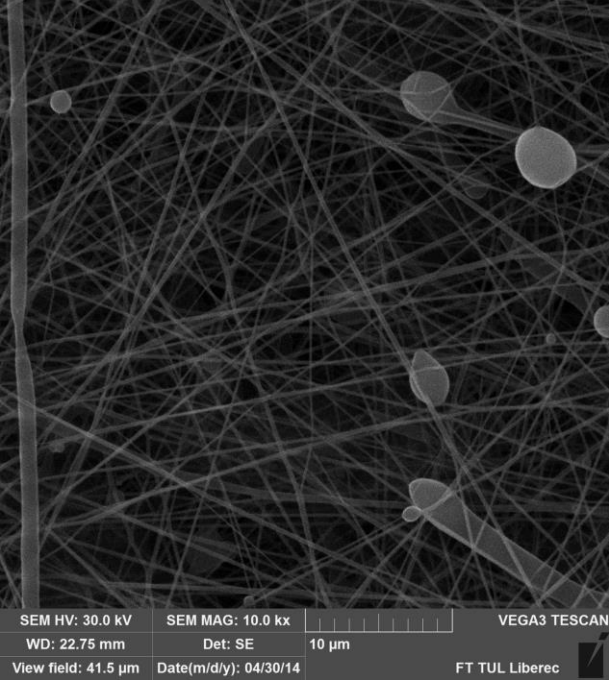


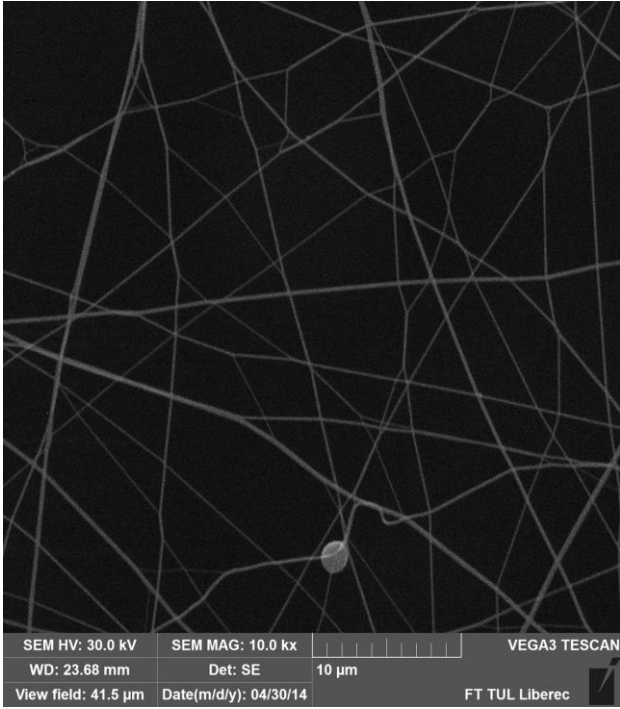
Příloha č. 2 – Skutečné rozměry vytištěných mřížek

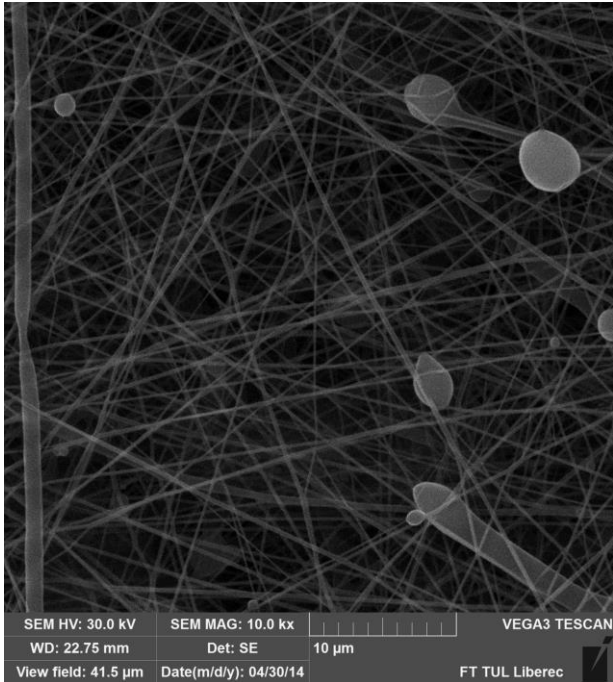
Mřížka vytvořená 3D tiskárnou				
Mikroskopický snímek mřížky	Naměřené hodnoty šíře příček [μm]			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4
	366,56	430,56	409,69	400,36
	486,11	444,50	396,48	356,29
	555,56	465,33	409,75	520,88
	548,61	458,33	375,53	377,05
	541,71	444,44	380,50	500,43
	486,11	423,61	436,23	416,67
	472,27	416,67	411,49	430,56
	422,21	486,31	368,37	437,50
	392,07	416,67	409,75	423,67
	500,00	486,11	419,84	444,66
	541,85	479,37	419,84	472,27
	527,78	506,94	406,20	451,44
	527,78	500,00	342,61	382,01
	562,54	520,83	404,79	437,50
	465,28	486,11	406,20	472,43
	430,61	425,64	415,91	423,61
	479,17	448,28	412,53	402,78
	472,22	366,56	464,99	437,56
	527,82	390,25	407,13	444,44
	437,50	395,28	424,52	444,44
	402,78	422,21	548,61	479,17
	527,78	377,05	527,96	458,54
	500,05	410,68	417,00	452,24
	423,61	346,27	415,29	395,89
	388,95	391,22	347,92	389,25
			361,00	411,33
Střední hodnota [μm]	441,28			
Směrodatná odchylka [μm]	52,87			
Počet	100			
Medián [μm]	430,55			
Modus [μm]	486,11			
Minimum [μm]	342,61			
Maximum [μm]	562,54			

Příloha č. 3 – Parametry nanovláknenných vrstev

Vláknenná vrstva PCL 14k				
Mikroskopický snímek vláknenné vrstvy	Naměřené hodnoty ϕ vláken [nm]			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4
	287,52	148,39	315,16	285,47
	241,81	199,97	223,29	254,57
	195,44	172,81	246,59	278,86
	329,25	263,96	248,93	213,38
	112,91	212,86	189,14	264,43
	219,66	188,91	214,58	115,66
	211,96	273,36	262,87	192,39
	166,94	219,98	271,31	236,79
	218,91	218,58	283,17	109,14
	237,41	243,63	258,86	157,86
	297,38	251,75	306,12	210,58
	274,68	211,76	232,12	138,05
	189,59	288,72	198,55	184,12
	182,17	169,32	215,81	148,90
	153,12	214,81	215,46	116,45
	232,97	239,82	245,18	157,86
	162,82	213,68	288,47	176,49
	141,52	241,19	322,25	135,37
	192,81	317,95	247,89	255,41
	163,94	233,11	287,22	158,44
	347,82	231,28	181,51	143,90
	298,91	159,93	198,96	176,49
	234,12	205,36	212,58	154,34
	230,96	325,46	212,58	191,44
	185,35	316,31	254,65	208,46
Střední hodnota [nm]	220,57			
Směrodatná odchylka [nm]	54,24			
Počet	100			
Medián [nm]	215,63			
Modus [nm]	157,86			
Minimum [nm]	109,13			
Maximum [nm]	347,82			

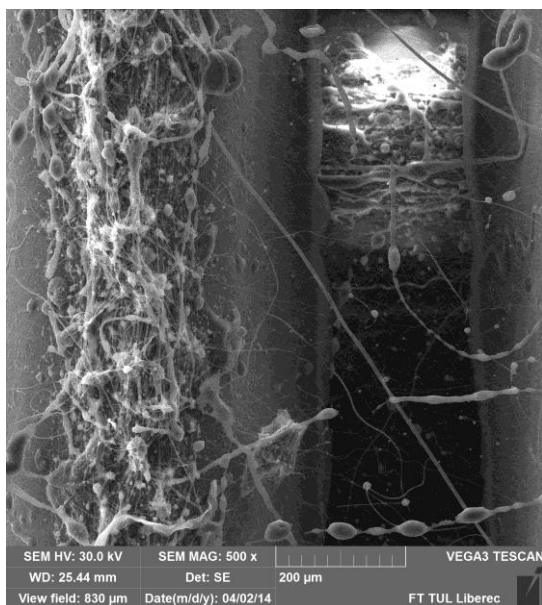
Vláknenná vrstva PCL 45k				
Mikroskopický snímek vláknenné vrstvy	Naměřené hodnoty ϕ vláken [nm]			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4
	312,36	191,25	203,96	205,56
	173,23	302,22	243,92	239,31
	231,11	191,41	245,52	195,74
	270,88	231,72	161,15	209,99
	138,55	139,62	202,56	163,55
	165,34	243,99	232,52	231,29
	117,81	246,32	144,95	204,77
	197,11	175,53	176,51	137,10
	138,25	245,53	247,89	350,56
	189,93	228,83	134,35	120,24
	246,06	239,62	254,23	300,61
	186,49	196,67	256,65	195,74
	179,13	246,62	285,57	215,10
	195,41	156,68	178,83	241,98
	128,21	345,45	168,82	137,10
	179,23	215,28	212,26	231,29
	187,39	293,39	172,55	216,77
	144,58	132,86	254,47	195,74
	185,81	232,82	214,11	190,12
	208,86	273,96	212,78	216,77
	238,81	159,33	191,25	247,89
	215,51	287,13	213,31	228,14
	215,58	161,73	232,21	285,57
	235,51	204,66	172,11	178,83
	197,81	147,96	195,02	168,82
	224,13	146,31	218,96	212,26
Střední hodnota [nm]	208,41			
Směrodatná odchylka [nm]	47,75			
Počet	100			
Medián [nm]	207,21			
Modus [nm]	195,74			
Minimum [nm]	117,81			
Maximum [nm]	350,56			

Vláknenná vrstva PCL 14k				
Mikroskopický snímek mřížky	Naměřené plochy pórů [μm^2]			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4
	31,507	10,502	12,384	6,53
	21,396	16,268	11,986	14,223
	3,875	62,689	18,756	15,263
	11,671	14,38	19,952	10,78
	44,091	17,575	21,338	13,554
	60,324	17,152	17,28	24,067
	19,185	14,044	22,67	17,319
	37,346	7,446	21,801	23,765
	16,578	8,968	8,762	19,039
	16,021	16,895	18,132	12,291
	12,991	9,895	12,458	12,76
	9,949	5,558	19,296	14,361
	10,505	26,565	35,554	31,612
	11,634	10,435	14,389	15,777
	14,752	18,59	12,892	23,697
	17,362	56,782	3,751	17,388
	32,473	129,491	8,576	29,883
	24,295	5,248	28,237	12,563
	13,319	13,762	8,346	24,24
	11,403	39,102	18,681	12,216
	39,387	10,59	17,749	15,029
	8,433	10,082	20,697	16,72
	7,81	16,406	13,83	59,508
	52,35	21,678	9,154	21,683
	12,174	21,443	6,071	35,174
Střední hodnota [μm^2]	20,24			
Směrodatná odchylka [μm^2]	16,42			
Počet	100			
Medián [μm^2]	16,33			
Modus [μm^2]	-			
Minimum [μm^2]	3,75			
Maximum [μm^2]	129,49			

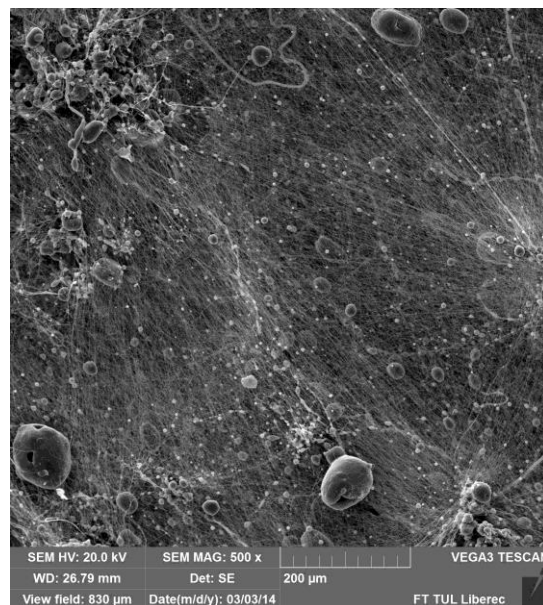
Vláknenná vrstva PCL 45k				
Mikroskopický snímek vláknenné vrstvy	Naměřené plochy pórů [μm^2]			
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4
	1,481	0,982	0,721	0,844
	1,574	1,11	0,449	1,035
	1,007	1,48	0,83	0,818
	0,434	1,172	0,519	0,958
	0,312	1,729	0,853	0,948
	0,915	0,598	0,597	0,892
	0,334	2,113	0,978	1,119
	0,704	1,352	0,49	1,627
	2,228	1,342	0,679	0,872
	1,428	1,677	1,232	0,568
	0,985	1,411	1,679	1,464
	0,806	2,421	1,099	1,505
	0,962	1,026	1,185	0,964
	0,886	1,541	1,439	1,315
	1,02	1,964	1,249	0,864
	0,97	1,226	0,863	0,77
	0,965	0,736	0,812	0,986
	1,432	1,037	1,286	0,826
	1,061	1,16	1,329	1,076
	0,386	1,202	1,372	1,92
	1,441	1,16	1,413	0,817
	1,147	2,437	0,747	1,177
	1,997	1,126	0,516	0,991
	1,228	1,221	1,012	0,911
	1,428	0,593	0,944	1,846
Střední hodnota [μm^2]	1,12			
Směrodatná odchylka [μm^2]	100			
Počet	0,43			
Medián [μm^2]	1,03			
Modus [μm^2]	1,42			
Minimum [μm^2]	0,31			
Maximum [μm^2]	2,43			

V následující tabulce je zaznamenáno měření plošných hmotností (pouze orientační hodnoty) u obou typů vlákněných vrstev zachycených na podkladové odtahové textilii v lince Nanospider a jsou zde také porovnány vizuální rozdíly těchto vrstev a vrstev zachycených na scaffoldech.

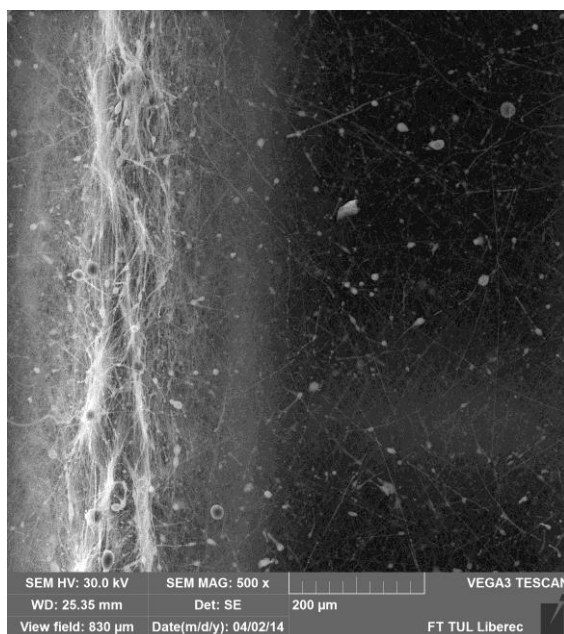
Vrstva PCL 45k Plošná hmotnost [g/m ²]		Vrstva PCL 14k Plošná hmotnost [g/m ²]	
22,5	15	42,5	37,5
32,5	22,5	37,5	50
35	25	52,5	67,5
37,5	20	65	52,5
30	17,5	62,5	55
17,5	32,5	67,5	60
Průměrná hodnota	25,625 g/m²	Průměrná hodnota	54,627 m/m²



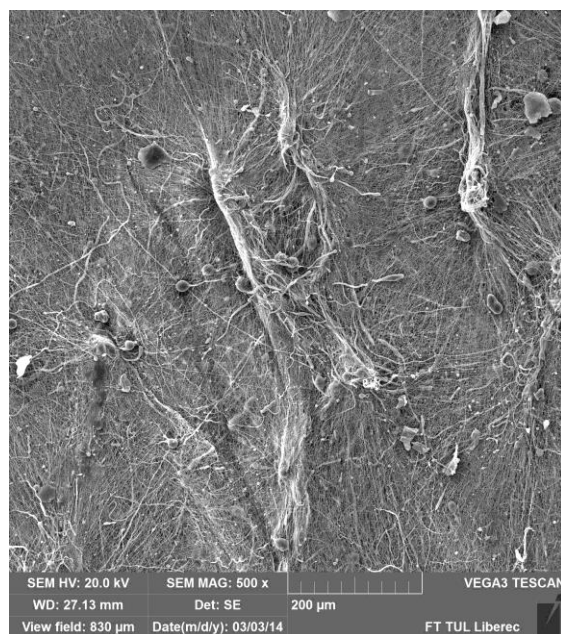
*Vlákněná vrstva PCL 14k na mřížce scaffoldu
(zvětšeno 500x)*



*Vlákněná vrstva PCL 14k z odtahové textilie
(zvětšeno 500x)*



*Vláknenná vrstva PCL 45k na mřížce scaffodlu
(zvětšeno 500x)*



*Vláknenná vrstva PCL 45k z odtahové textilie
(zvětšeno 500x)*

Příloha č. 4 – Materiály a postupy biologického testování

PBS pufr – phosphate-buffered saline, fosfátový pufr sloužící k udržování konstantního pH, kyselinou chlorovodíkovou je rozpuštěno: 800 ml dH₂O, 8 g NaCl (137 mM), 0,2 g KCl (2,7mM), 1,44 g NaH₂PO₄ (nebo 3,63 g NaH₂PO₄.12 H₂O (10 mM), 0,24 g KH₂PO₄ (1,76mM). U této suspenze je upraveno pH na 7,4 a objem je doplněno do 1 l dH₂O.

Trypsin - trávicí enzym dvanáctníku (prasete); patří mezi hydrolázy, vzniká ve slinivce břišní jako proenzym trypsinogen, v dvanáctníku je enzymaticky aktivován enterokinázou a dříve vzniklými molekulami trypsinu na trypsin (tzv. autokatalýza), štěpí peptidické vazby na C-terminální straně aminokyselin lysinu a argininu pokud nenásleduje prolin. V našem případě je roztok trypsinu používán k uvolnění adherovaných buněk ode dna kultivační lahve při pasážování.

EMEM - Eagle's minimal Essentials medium – kultivační médium; obsahuje glukózu, aminokyseliny, vitamíny, soli, antibiotika a další látky, jako např. železo a fenolovou červen. Ta slouží ke sledování změn pH v médiu během kultivace buněk. Odpadní produkty metabolizujících, rostoucích buněk jsou kyselé, snižují pH média a barva média se mění do oranžova až dožluta. Pak je nutné médium vyměnit. která představuje indikátor pH – barví se podle pH

FBS - Fetal bovine serum – část krevní plazmy plodu skotu

Glutaraldehyd – 2,5% roztok glutaraldehydu v PBS

Rozmražení buněk

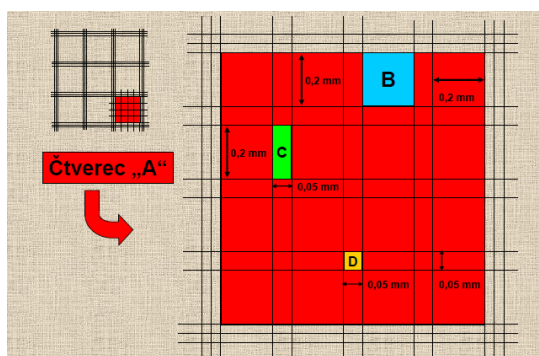
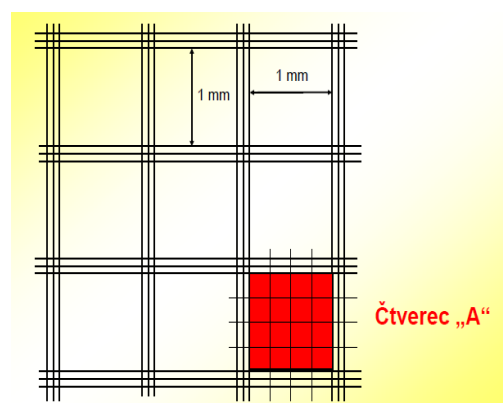
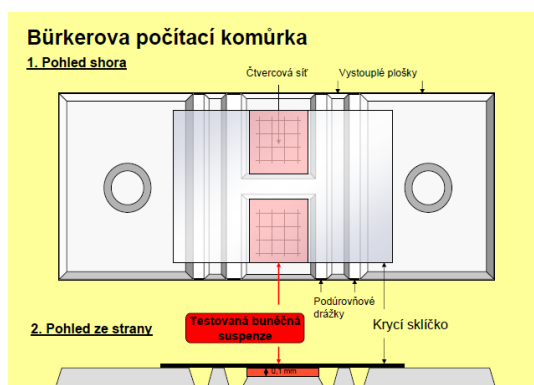
- 1) Připravit si médium EMEM (10% FBS, 1% směs antibiotik) a dát ho do vodní lázně nahřát na 37°C.
- 2) Kryozkumavku s buňkami vložit do vodní lázně.
- 3) Po rychlém rozmrazení celý obsah kryozkumavky přenést do kultivační lahvičky se 14 ml vytemperovaného média a kultivační lahvičku vložit do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂)
- 4) Druhý den zkontrolovat pod mikroskopem, zda buňky adherovaly na dno kultivační lahve.

Pasážování buněk

- 1) Z kultivační lahvičky odsát médium, přidat k buňkám cca 2 ml PBS pufru. Buňky opláchnout a pufr odsát.
- 2) Přidat 2 ml trypsinu a kultivační lahvičku vložit na 5 - 10 minut do termostatu.
- 3) Během trypsinizace kontrolovat buňky pod mikroskopem, zda dochází k oddělení buněk od povrchu lahvičky (zakulacení buněk, plavání v médiu).
- 4) Po 2-3 minutách buňky mechanicky sklepat ze dna a přidat 6 ml připraveného média (EMEM). Buňky šetrně rozsuspendovat v tomto médiu (rozbít shluky buněk).
- 5) Určit počet buněk v 1 ml v Bürkerově komůrce Přenést 3×10^5 buněk do nové 75 cm² kultivační lahvičky a přidat čerstvé médium (celkový objem 15 ml).
- 6) Buňky v nové kultivační lahvičce zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do termostatu (37°C, 5 % CO₂).

Počítání buněk v Bürkerově komůrce

- 1) Do Bürkerovy komůrky přidat dvě kapky buněčné suspenze a celý preparát pozorovat pod mikroskopem
- 2) Několikrát spočítat buňky ve čtverci zvolené velikosti (min 20x)
- 3) Vypočítat průměrný počet buněk v 1ml média



Rozměry Bürkerovy počítací komůrky

	rozměry (mm)	plocha (mm ²)	objem (mm ³)
větší čtverec	0,2 x 0,2	$0,04 = \frac{1}{25}$	$0,004 = \frac{1}{250}$
obdélník	0,05 x 0,2	$0,01 = \frac{1}{100}$	$0,001 = \frac{1}{1000}$
menší čtverec	0,05 x 0,05	$0,0025 = \frac{1}{400}$	$0,00025 = \frac{1}{4000}$

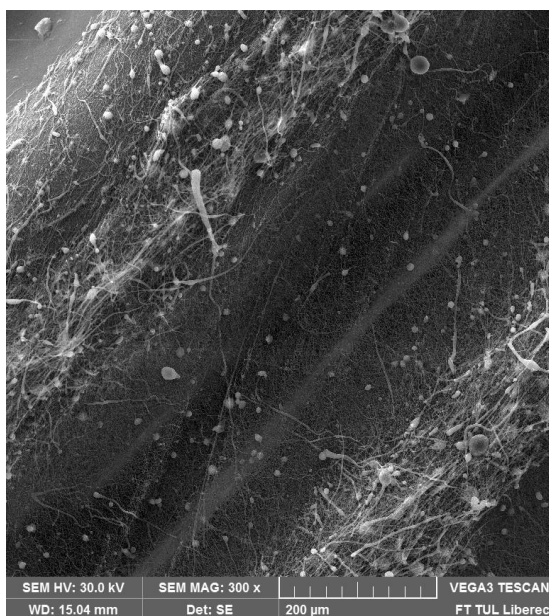
Barvení buněk pro fluorescenční mikroskopii

- 1) Vzorky scaffoldů přendat do čistých kultivačních jamek
- 2) Buňky fixovat pomocí vymraženého ethanolu
- 3) Čtyřikrát opláchnout buňky roztokem PBS
- 4) Přidat barvicí roztok, v tomto případě proprium Iodid
- 5) Čtyřikrát opláchnout buňky roztokem PBS
- 6) Pozorovat buňky fluorescenčním mikroskopem

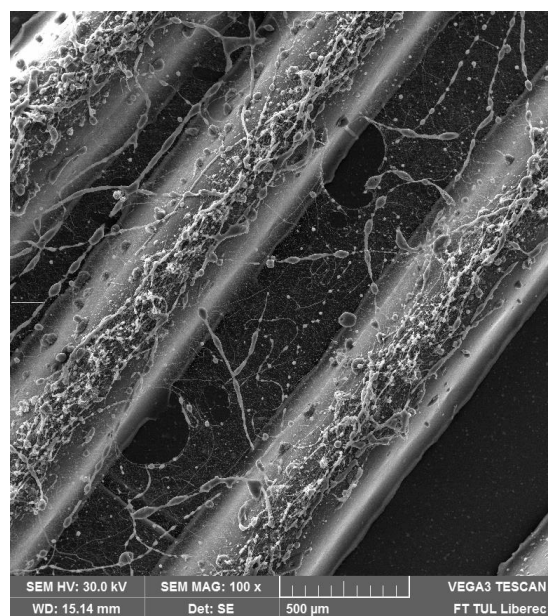
Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

- 1) Vzorky scaffoldů přendat do čistých kultivačních jamek
- 2) Buňky fixovat pomocí 2,5% glutaraldehydu (v PBS)
- 3) Preparáty vysušit pomocí ethanolové řady (70%, 80%, 90%, 96%, 100% ethanolu), v každé koncentraci ethanolu je nutné ponechat vzorek alespoň 10 minut
- 4) Dosušit vzorky volně na parafilmu
- 5) Nalepit na terčíky a pozlatit
- 6) Pozorovat vzorky pod elektronovým mikroskopem

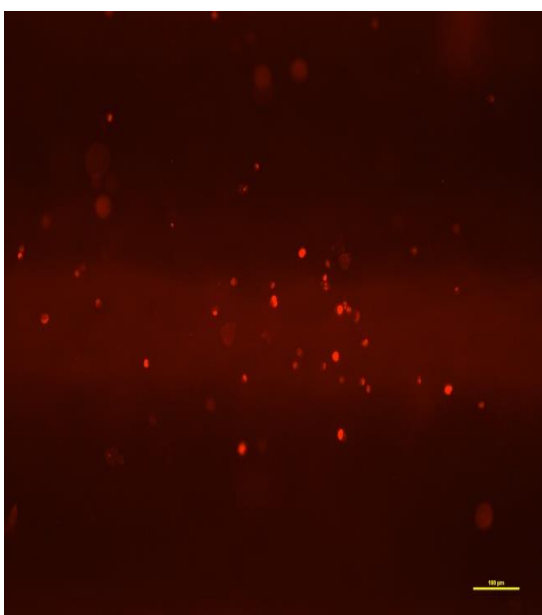
Příloha č. 5 – Mikroskopické snímky z biologického testování - I



Snímek z elektronové mikroskopie (14. testovací den, PCL 45k, mřížka „600“)



Snímek z elektronové mikroskopie (14. testovací den, PCL 14k, mřížka „600“)

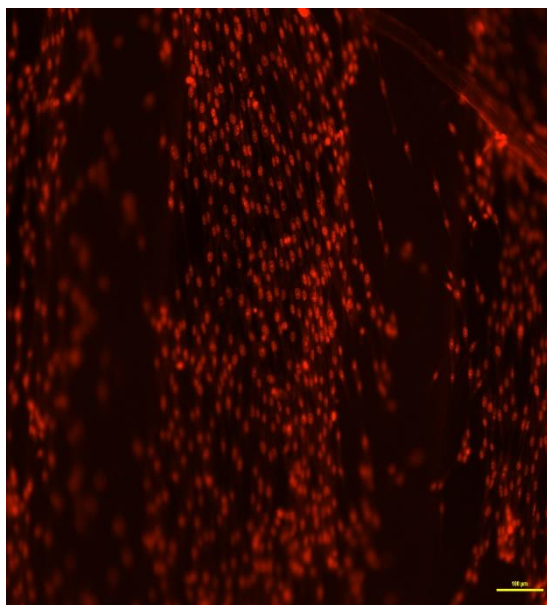


Snímek z fluorescenční mikroskopie (7. testovací den, PCL 45k, mřížka „600“, zvětšeno 100x)

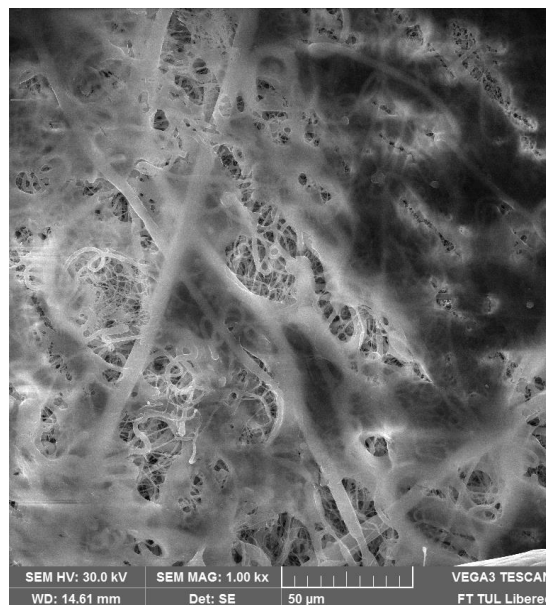


Snímek z fluorescenční mikroskopie (7. testovací den, PCL 14k, mřížka „400“, zvětšeno 100x)

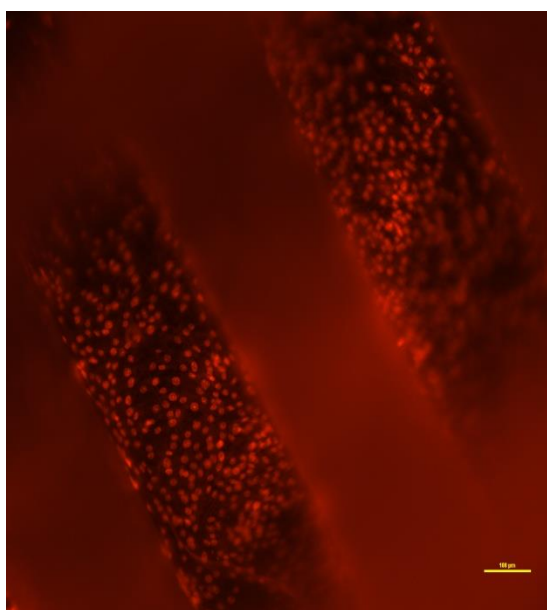
Příloha č. 6 – Mikroskopické snímky z biologického testování – II



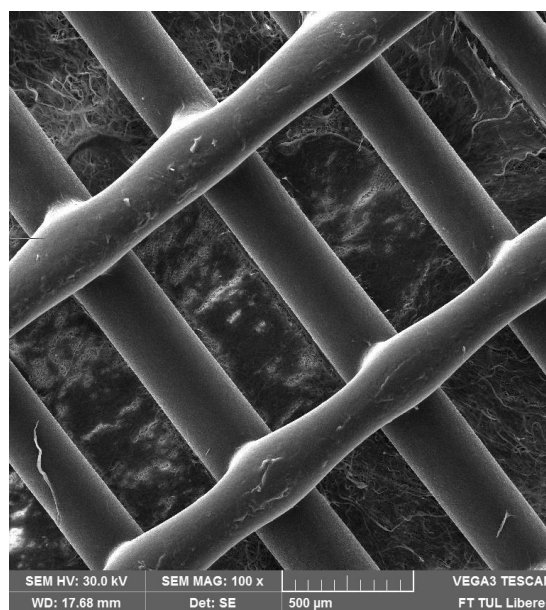
*Snímek z fluorescenční mikroskopie
(3. testovací den, zvětšeno 100x)*



*Snímek z elektronové mikroskopie
(3. testovací den)*



*Snímek z fluorescenční mikroskopie
(7. testovací den, zvětšeno 100x)*



*Snímek z elektronové mikroskopie
(7. testovací den)*